

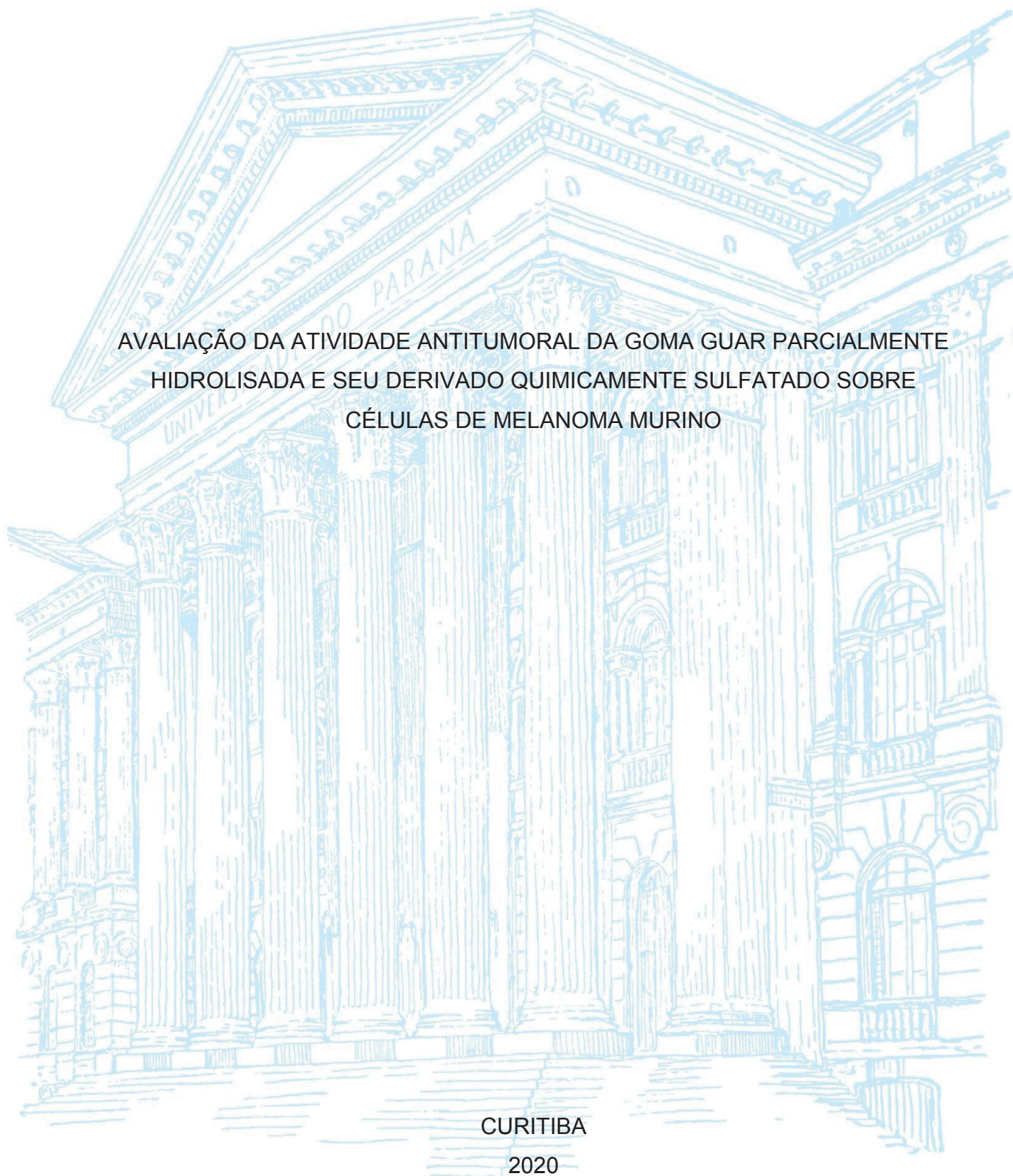
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ODAIR BRAZ JUNIOR

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA GOMA GUAR PARCIALMENTE
HIDROLISADA E SEU DERIVADO QUIMICAMENTE SULFATADO SOBRE
CÉLULAS DE MELANOMA MURINO

CURITIBA

2020



ODAIR BRAZ JUNIOR

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA GOMA GUAR PARCIALMENTE
HIDROLISADA E SEU DERIVADO QUIMICAMENTE SULFATADO SOBRE
CÉLULAS DE MELANOMA MURINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Fogagnoli Simas.

Coorientador: Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Braz Junior, Odair

Avaliação da atividade antitumoral da goma guar parcialmente hidrolisada e seu derivado quimicamente sulfatado sobre células de melanoma murino. / Odair Braz Junior. – Curitiba, 2020.

77 p.: il.

Orientadora: Fernanda Fogagnoli Simas

Coorientador: Edvaldo da Silva Trindade

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Melanoma. 2. Anticoagulantes. 3. Galectinas. I. Título. II. Simas, Fernanda Fogagnoli, 1979-. III. Trindade, Edvaldo da Silva, 1971-. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (22. ed.) 614.5999477



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **ODAIR BRAZ JUNIOR** intitulada: **ATIVIDADE ANTITUMORAL DA GOMA GUAR PARCIALMENTE HIDROLISADA E SEU DERIVADO QUIMICAMENTE SULFATADO SOBRE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO**, sob orientação da Profa. Dra. FERNANDA FOGAGNOLI SIMAS, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 31 de Março de 2020.

Assinatura Eletrônica

02/04/2020 16:04:51.0

FERNANDA FOGAGNOLI SIMAS

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

09/04/2020 16:59:09.0

FHERNANDA RIBEIRO SMIDERLE

Avaliador Externo (INSTITUTO PELÉ PEQUENO PRINCIPE)

Assinatura Eletrônica

02/04/2020 16:20:20.0

FRANCISCO FILIPAK NETO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por toda ajuda, paciência e inteligência que me deu e tem para comigo, agradeço a minha família por todo apoio emocional e estarem disponíveis para mim quando eu tenho algum problema. Também gostaria de agradecer as pessoas com quem a vida foi separando do meu caminho, mas durante algum tempo foram extremamente importantes para mim, e as vezes a vida simplesmente acontece e as deixamos.

Queria agradecer a Prof^a. Dr^a. Fernanda, pois mesmo eu não acreditando em mim, sempre pra baixo e meio desmotivado, ela nunca desistiu e sempre me motivou e acreditou nesse trabalho, e graças a ela e sua empolgação consegui ver que os resultados realmente eram promissores e me deu forças para continuar. Gostaria de agradecer também pois nos momentos de crises existenciais, e das dúvidas sobre a vida ela sempre esteve disposta para me ajudar, e conversar comigo.

Ao Prof. Dr. Edvaldo que me aceitou no laboratório em 2016, me orientou no TCC, e durante o mestrado mesmo estando ocupado com suas funções na direção sempre se mostrou interessado e disposto a me ajudar.

Ao Gustavo, que mesmo não querendo um aluno de IC me ajudou e me ensinou muita coisa, sempre conversava comigo sobre os protocolos, e qual a melhor saída para fazer os experimentos, ou para chegar a um resultado. E ele sempre percebia quando eu iria começar a surtar, e antes mesmo de eu falar alguma coisa ele já me colocava no chão e falava para ter calma e não me deixava pirar.

A Prof^a. Dr^a. Carolina, por todo apoio, estando disponível para ajuda científica e pessoal.

Ao Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas, do Depto. de Química da UFPR, pela colaboração nos experimentos de ligação à galectinas

Aos colegas de laboratório João e Daniel, pelas conversas sobre jogos, Magic e Pokémon, e eventualmente sobre os protocolos e “coisas relacionadas a ciência”.

Aos demais colegas de laboratório por toda ajuda nos experimentos seja para discutir, ensinar ou dar uma mão para realizar os ensaios (Stellee, Aline, Anderson, Maíra, Keila, Yasmin, Camila, Israel, Victória, Vivi). Ao Pedro que mesmo não sendo do mesmo laboratório, entrou no mestrado junto comigo e sempre conversávamos nos corredores, geralmente sobre futebol, e pela ajuda com alguns experimentos.

Ao CTAF, principalmente ao Israel, pela ajuda com os equipamentos e para o preparo das amostras.

À Prof^a. Dra. Fhernanda Smiderle e ao Prof. Dr. Francisco Filipak Neto por
aceitarem ser avaliadores do meu trabalho.

À UFPR pelos 7 anos que estive aqui praticamente em tempo integral.

À Capes pela bolsa de mestrado.

Ao CNPq e CAPES que financiaram esse projeto.

***Let everything happen to you: beauty and terror.
Just keep going. No feeling is final.***

(Rainer Maria Rilke, Go to the Limits of Your Longing, 1905)

RESUMO

O melanoma é o tipo de câncer de pele mais agressivo e letal e se desenvolve a partir de mutações que ocorrem nos melanócitos. A taxa de sobrevida dos pacientes após 5 anos é de aproximadamente 5%. Se diagnosticado precocemente o prognóstico é bom e em geral é resolvido após remoção cirúrgica, porém em estágios mais avançados o melanoma é altamente refratário aos quimioterápicos usualmente utilizados, que além de diminuir a qualidade de vida do paciente não aumentam significativamente sua expectativa de vida. Dessa forma, a busca por novas terapias é de grande interesse para a saúde pública. Nesse sentido, nosso Grupo de Pesquisa tem buscado a utilização de polissacarídeos não citotóxicos, porém capazes de reprogramar células tumorais ou o microambiente tumoral alterando o fenótipo de malignidade. O presente trabalho utilizou a goma guar parcialmente hidrolisada (uma galactomanana comercial extraída das sementes da planta *Cyamops tetragonoloba*) (GGH) e seu derivado quimicamente sulfatado (GGHS) nos testes de atividades anti melanoma. A escolha destes derivados justifica-se pois o GGH é estruturalmente similar ao Davanat[®], um produto patenteado que tem ação antitumoral (via ligação à galectinas) bem descrita na literatura, e o GGHS é um derivado com comprovada atividade anticoagulante, que, assim como outros heparinóides, tem potencial pra ser utilizado em pacientes oncológicos prevenindo a trombose associada ao câncer. Ambos os polissacarídeos não alteraram a viabilidade das células de melanoma nem de fibroblastos de linhagem normal, porém, o GGHS provocou diminuição da proliferação das células de melanoma B16-F10, na concentração de 100 µg/mL, após 72h de tratamento. GGHS também alterou a morfologia das células de melanoma quando estas foram cultivadas sobre matriz extracelular artificial (matrigel[®]). GGH e GGHS diminuíram a capacidade invasiva do melanoma em 36% e 29%, respectivamente, e aumentaram a adesão destas células sobre o matrigel[®], característica esta que pode estar associada ao perfil menos invasivo das células tumorais. Nos ensaios clonogênicos, a presença de GGH e GGHS (100 µg/mL) nas culturas celulares provocou a diminuição do tamanho das colônias formadas em 12% e 48%, sem diminuir o número de colônias observadas, resultado que está de acordo com os dados de viabilidade e proliferação celular. Quanto ao perfil migratório, quando as células de melanoma estavam em contato com GGH elas migravam 25% menos do que as células não tratadas. Entretanto, GGHS não se mostrou efetivo em reduzir a migração celular. Os parâmetros de malignidade descritos acima estão relacionados com vias de sinalização que envolvem galectina-1 e galectina-3 e os polissacarídeos testados no presente trabalho, especialmente GGH, tem alto potencial de ligação nestas moléculas. Desta maneira, foram realizadas análises preliminares de ligação destes polissacarídeos nestas galectinas pelo método de micro balança de quartzo (QCM-D) e foi verificado que ambos os polissacarídeos se ligam nas galectinas 1 e 3. Tal resultado aponta para um dos alvos possíveis dos polissacarídeos GGH e GGHS, os quais, baseados nos resultados descritos, mostraram-se promissores na terapia antimelanoma.

Palavras-chave: Melanoma, B16-F10, goma guar, anticoagulante, galectinas.

ABSTRACT

Melanoma is the most aggressive and lethal type of skin cancer and it develops from mutations that occur in melanocytes. The survival rate of patients after 5 years of disease progression is approximately 5%. In early stages it is usually resolved after surgical removal, but in more advanced stages melanoma is highly refractory to chemotherapy, which usually decreases patient's life quality and does not significantly increase life expectancy. Thus, searching for new therapies is extremely important and it is a matter of interest to public health. In our laboratory we search polysaccharides that do not cause toxicity to tumor cells but can reprogram these cells by altering the phenotype of malignancy. This study used hydrolyzed guar gum (a commercial galactomannan extracted from the seeds of *Cyamopsis tetragonoloba* plant) (GGH) and its chemically sulfated derivative (GGHS). GGH has similar structure with Davanat[®], patented product, other polysaccharide obtained from guar gum hydrolysis, and has its antitumoral activity already described (being a galectin-1 ligand), and GGHS has its anticoagulant activity described, and the interest in this type of polymer is in the fact that heparin is already currently used in the clinic in cancer patients due to the tendency of these patients to develop thrombosis. Both polysaccharides used in this study did not alter melanoma and fibroblasts cells viability, although GGHS demonstrated a decrease in the proliferation of melanoma B16-F10 cells, at the concentration of 100 µg/ml during 72h of treatment, GGHS also led to a morphological change of melanoma cells when grown on the matrigel[®]. GGH and GGHS decreased cell invasion capacity by 36% and 29%, respectively, and increasing cell adhesion on matrigel[®] which could be associated with diminished invasion capacity. In clonogenic assay GGH and GGHS (100 µg/ml) did not alter the number of colonies but was able to diminish the size of colonies by 12% and 48%, respectively, this data corroborates with viability and proliferation results. GGH also diminish the migratory profile of melanoma cells in 25%, although GGHS did not alter this parameter. Galectins 1 and 3 are involved in all malignancy parameters described above, and to investigate if GGH and GGHS are able to interact with those proteins a quartz crystal microbalance (QCM-D) was used, and both polysaccharides were able to bind to galectins 1 and 3. This result suggest one possible way for antitumoral activity of GGH and GGHS could be by galectins. Both polysaccharides used in this study presented promising antimelanoma results.

Keywords: Melanoma, B16-F10, guar gum, anticoagulant, galectins.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 CÂNCER	17
1.1.1 MELANOMA.....	19
1.1.1.2 TRATAMENTOS ANTIMELANOMA.....	21
1.1.1.1.1 POLISSACARÍDEOS NO TRATAMENTO DO CÂNCER	23
1.1.2 GALECTINAS COMO POSSÍVEIS ALVOS MOLECULARES DE POLISSACARÍDEOS ANTITUMORAIS	26
1.2 OBJETIVOS	30
1.2.1 Objetivo geral	30
1.2.2 Objetivos específicos.....	30
2 MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	30
2.2 LINHAGENS E CULTIVO CELULAR	32
2.3 AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR	32
2.4 ANÁLISE DE MORTE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO	34
2.5 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE CLONOGÊNICA.....	35
2.6 ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E MICROSCOPIA CONFOCAL	35
2.7 MIGRAÇÃO CELULAR	36
2.8 INVASÃO CELULAR.....	37
2.9 ADESÃO CELULAR.....	38
2.10 ANÁLISE DE CICLO CELULAR.....	39
2.11 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GALECTINA-3 EM CÉLULAS B16-F10.....	39
2.12 ANÁLISE DA LIGAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS NAS GALECTINAS 1 E 3 POR MICRO BALANÇA DE QUARTZO (QCM-D)	40
2.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	41
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	41
3.2 INFLUÊNCIA DOS POLISSACARÍDEOS NA VIABILIDADE, PROLIFERAÇÃO E MORTE CELULAR.....	41
3.1 AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS POLISSACARÍDEOS NA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR.....	46

SUMÁRIO

3.2 EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS NA MORFOLOGIA CELULAR	47
3.3 INFLUÊNCIA DOS POLISSACARÍDEOS GGH E GGHS SOBRE PARÂMETROS DE MALIGNIDADE.....	52
3.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE LIGAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS EM GALECTINAS.....	59
3.5 PRESENÇA DE GALECTINA-3 NAS CÉLULAS DE MELANOMA	62
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
5 CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS.....	65
ANEXO 1.....	73
ANEXO 2.....	76

1 Introdução

O melanoma é o tipo de câncer de pele menos incidente, porém o responsável por 80% das mortes devido à câncer de pele. Como o principal fator de risco do melanoma é a exposição à radiação UV, a incidência do melanoma tende a aumentar com as condições climáticas e ambientais que progressivamente expõem a população a situações de risco.

Como os tratamentos atuais não são totalmente satisfatórios, os efeitos colaterais são intensos e os tratamentos direcionados apresentam custo elevado, a busca por compostos que apresentam resultados positivos e baixa incidência de efeitos colaterais é de extrema importância. Neste sentido, nosso grupo de pesquisa vem buscando polissacarídeos que atuem alterando o perfil de malignidade tumoral sem apresentar efeitos citotóxicos, e, portanto, que apresentem menor incidência de efeitos colaterais em relação aos quimioterápicos usualmente aplicados.

Polissacarídeos vegetais têm sido amplamente estudados quanto às suas atividades antitumorais (CHEN et al., 2018b; JOSEPH et al., 2013; KWAN et al., 2016; VARGHESE et al., 2017). Dentre eles está o DAVANAT[®], que é produzido a partir de hidrólise ácida parcial da goma guar, cuja utilização comercial como espessante é amplamente conhecida na indústria de alimentos (ZOMER; KLYOSOV; PLATT, 2012). O DAVANAT[®] apresenta atividade antitumoral e imunomoduladora (DEMOTTE et al., 2014) e está em fase 2 de testes clínicos (CLINICALTRIALS.GOV IDENTIFIER: NCT00388700, 2006). Barddal e colaboradores (2020) descreveram a síntese de um polímero similar ao DAVANAT[®], porém com massa molar consideravelmente menor. No presente trabalho foi realizada a síntese de um novo lote deste derivado similar ao DAVANAT[®] de acordo com a metodologia proposta por Barddal e colaboradores (2020) e aqui ele foi denominado GGH. Testes de atividade antitumoral deste composto já foram descritas, porém em modelo de melanoma, o Davanat[®] ainda não tem na literatura sua atividade avaliada.

Dentre os polissacarídeos que tem sido estudados quanto à atividade antitumoral estão os polissacarídeos naturalmente ou quimicamente sulfatados (DANTAS-SANTOS et al., 2012; JAVADINIA et al., 2018; PARK et al., 2016; VARGHESE et al., 2017; ZHOU et al., 2018). Tais polissacarídeos podem apresentar também efeitos anticoagulantes, o que é interessante na terapêutica oncológica. Pacientes com câncer possuem grande probabilidade de desenvolver tromboembolismo, sendo os principais casos de trombose venosa profunda ou

embolismo pulmonar, e isso ocorre devido a capacidade das células tumorais ativarem a cascata de coagulação sanguínea (FALANGA; MARCHETTI; VIGNOLI, 2013; SHETH et al., 2017). Tais pacientes usualmente são tratados com heparina, tendo seu tempo de sobrevida aumentado. Além da sua ação anticoagulante, que previne que as células tumorais estimulem a agregação plaquetária na superfície das células que estão na corrente sanguínea e, assim, evadam à ação do sistema imune, alguns trabalhos têm relatado o efeito de heparinas, heparinas dessulfatadas e heparinas de baixo peso molecular diretamente sobre células tumorais, inclusive em estudos recentes em nosso Grupo de Pesquisa (FLUHR; SEITZ; ZYGMUNT, 2013; JAVADINIA et al., 2018; ROSSI et al., dados não publicados; SANTI et al., dados não publicados).

Barddal e colaboradores (2020), visando a produção de heparinóides vegetais, sulfataram quimicamente o derivado parcialmente hidrolisado da goma guar e o testaram quanto às suas propriedades anticoagulante e antitrombótica obtendo resultados positivos. Entretanto, tal polissacarídeo sulfatado possuía uma atividade menor do que a observada para heparina. Tal propriedade é interessante do ponto de vista da sua aplicação como agente antitumoral, uma vez que a heparina, por ser uma droga anticoagulante muito potente, pode provocar efeitos hemorrágicos severos.

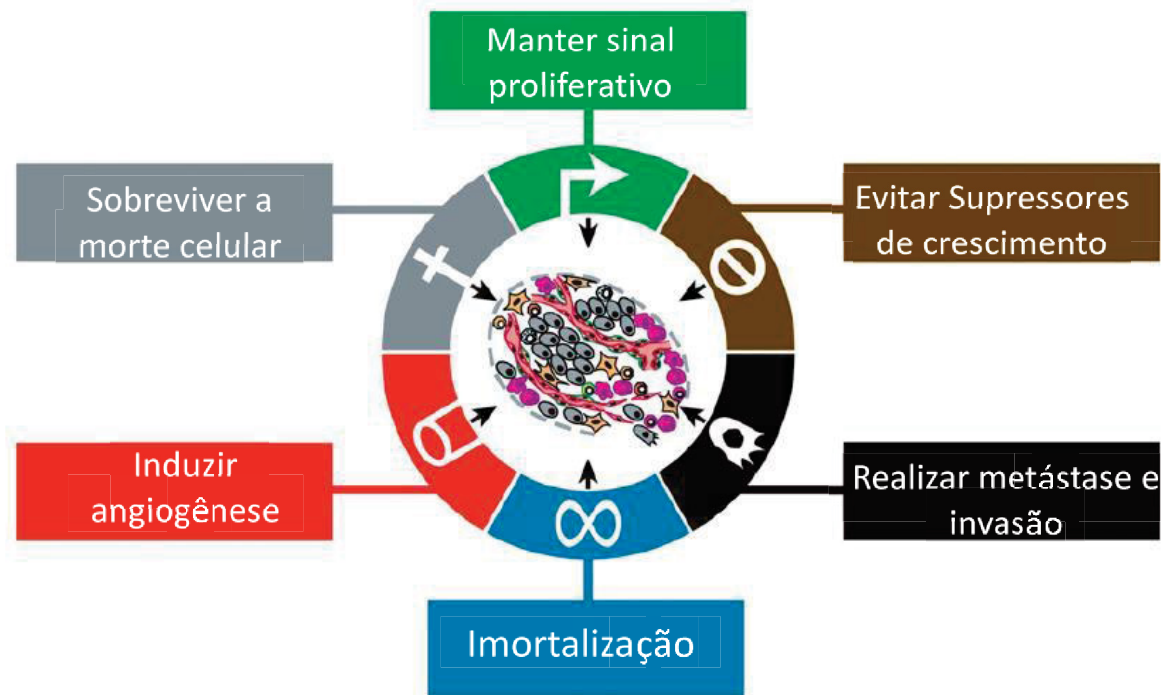
De posse dos dados descritos acima justifica-se o presente trabalho, que teve como objetivo sintetizar, baseado na metodologia descrita por Barddal et al. (2020), um polissacarídeo parcialmente hidrolisado e um polissacarídeo parcialmente hidrolisado e quimicamente sulfatado de acordo com Barddal e colaboradores (2020). Após obtenção e caracterização, os polímeros foram testados quanto às suas atividades antitumorais “*in vitro*” em células de melanoma. Vale ressaltar que o composto denominado GGH é similar ao DAVANAT®, que já apresenta comprovadas atividades antitumorais e que neste trabalho será testado em células de melanoma. O outro composto, GGHS, quimicamente sulfatado, será testado a fim de verificar se a presença de sulfato na estrutura do polímero modifica sua atividade antitumoral.

1.1 Câncer

De acordo com a Organização mundial da saúde (do inglês World Health Organization – WHO), o câncer pode ser caracterizado como o conjunto de doenças que tem em comum um crescimento desordenado e além dos seus limites naturais, podendo se espalhar para outros órgãos e partes do corpo, processo conhecido como metástase (WHO, 2018).

Segundo Hanahan e Weinberg (2000) existem 6 características que são comuns e importantes para o desenvolvimento do câncer (FIGURA 1). Entre elas estão, manter o sinal proliferativo, não responder supressores de crescimento, sobreviver a morte celular, induzir a angiogênese, promover a imortalização celular e realizar metástase e invasão.

FIGURA 1 – Principais Características Do Desenvolvimento Tumoral



A figura ilustra as principais características do desenvolvimento do câncer, Fonte: Adaptado de (HANAHAN; WEINBERG, 2000)

Em 2011, Hanahan e Weinberg propuseram outras duas características comuns a todos os tipos de câncer, sendo elas a capacidade de evadir da resposta imunológica do organismo e a reprogramação do metabolismo energético. Essas características atuam em conjunto promovendo uma maior sobrevivência da célula tumoral, levando a um aumento do tamanho do tumor sólido. A capacidade de invadir e formar metástase é decorrente de alterações nas moléculas que atuam na adesão célula-célula e célula-matriz e da produção de enzimas que degradam a matriz, dessa forma ocasionando o crescimento tumoral em uma região diferente do tumor de origem (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Segundo Fouad e Aanei (2017), novas características tumorais surgem no curso da evolução e progressão do câncer. As alterações no fenótipo das células cancerosas ou tumorais tem como objetivo facilitar a organização celular de uma maneira em que essa célula obtenha vantagens sobre as células saudáveis do tecido.

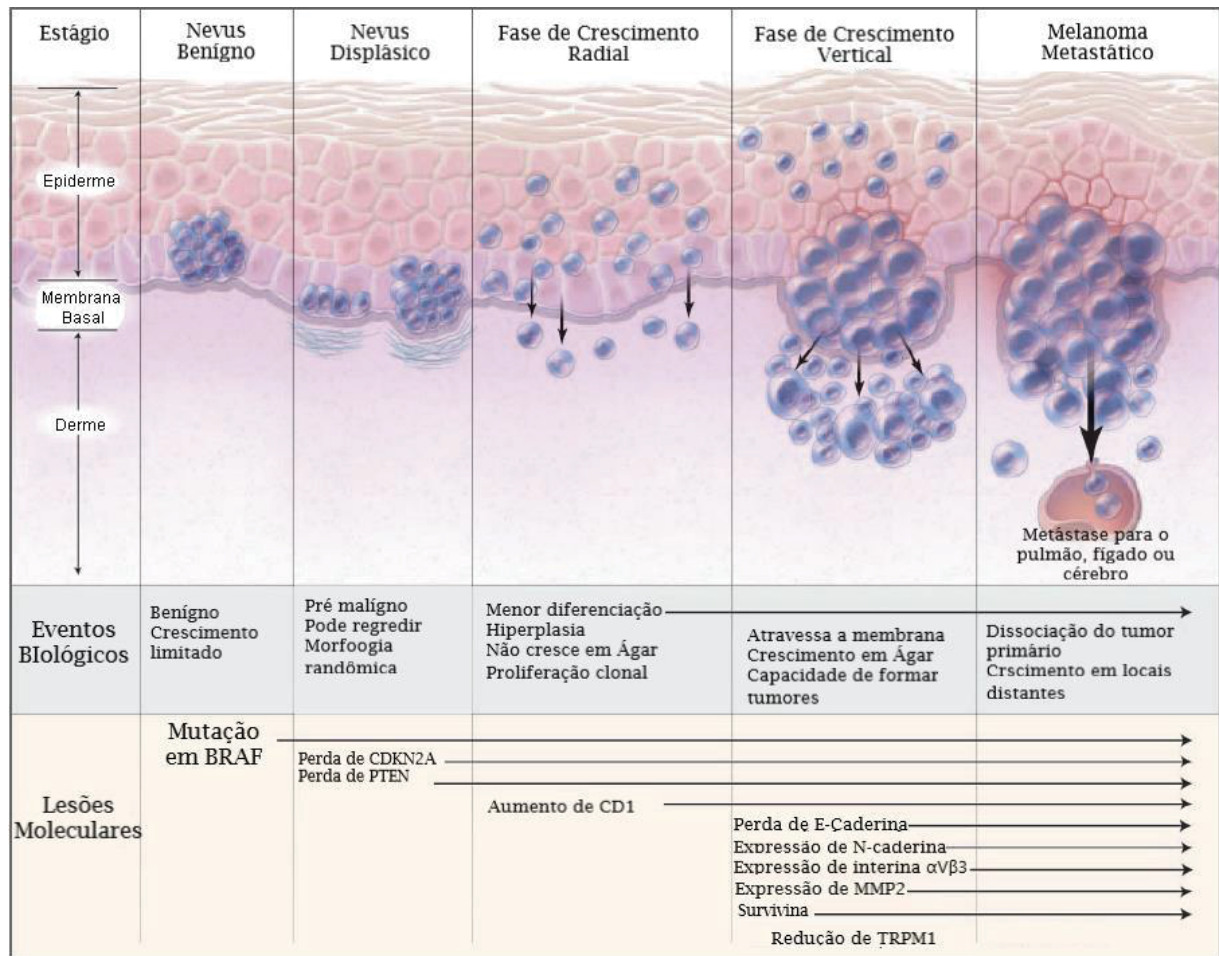
1.1.1 Melanoma

O melanoma é um tipo de câncer de pele que surge a partir de mutações no genoma dos melanócitos responsáveis por alterar a capacidade proliferativa dessas células, e tem como principais fatores de risco mutações decorrentes da exposição à radiação UV e o histórico familiar da doença (ARRANGOIZ, 2016; GORANTLA; KIRKWOOD, 2014; OBA-SHINJO et al., 2006). O melanoma metastático representa apenas 4% dos tumores malignos de pele, porém é responsável por 80% das mortes causadas por câncer de pele (JIANG et al., 2014). Quando diagnosticado precocemente pode ser facilmente removido cirurgicamente e possui alto índice de cura, mas uma vez que atinge um estado metastático o tratamento é extremamente complicado (MARGOLIS; MARKOVITS; MARKEL, 2019; QUINTANILLA-DIECK; BICHAKJIAN, 2019), sendo que a sobrevida dos pacientes após 1 e 2 anos do início da progressão do tumor são aproximadamente 25% e 10%, respectivamente (MAIO, 2012).

A incidência de melanoma tem aumentado mundialmente. No século passado era considerada uma doença rara, porém, atualmente está presente em aproximadamente 1 a cada 50 indivíduos em algumas populações ocidentais (RASTRELLI et al., 2014). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2018) a estimativa de novos casos de melanoma no Brasil em 2018 era de 6.260, e segundo a WHO no mundo todo há 132 mil novos casos a cada ano (WHO, 2017).

O melanoma possui alta capacidade metastática e isso ocorre pois existem moléculas de adesão presentes na superfície das células de melanoma que também estão presentes nos vasos sanguíneos, como por exemplo a VE-caderina e dessa forma as células conseguem invadir o endotélio dos vasos e chegar na corrente sanguínea mais facilmente (GAMAL-ELDEEN; AMER; HELMY, 2006; HAASS et al., 2005). A progressão do melanoma é dividida em 5 fases: 1 - Formação de um nevus benigno; 2 – Formação de nevus displásico; 3 - Crescimento radial; 4 - Crescimento vertical; 5 - Melanoma metastático (FIGURA 2).

FIGURA 2 – Progressão do Melanoma



LEGENDA: Progressão do melanoma, eventos biológicos e mutações que ocorrem durante o processo. FONTE: adaptado de (MILLER; MIHM, 2006).

Durante a formação do nevus benigno, os melanócitos já apresentam um crescimento desregulado, porém limitado, sendo rara a sua progressão para a formação de um melanoma. Porém mutações em vias de sinalização como a MAPK/ERK culminam na formação de um nevus displásico, com alteração na morfologia das células e formando um melanoma primário (MILLER; MIHM, 2006).

Na fase de crescimento radial o tumor ainda não possui a capacidade metastática, capacidade que já está presente durante o crescimento vertical. Em estágios mais avançados, as células acumulam diversas mutações (FIGURA 2), entre elas em: Cdkn2 que é responsável pela síntese das proteínas supressoras de tumor P16NK4A e P14ARF; PTEN e MITF, também supressores de tumor; CCND1 que codifica para a ciclina D1, que estimula a entrada da célula no ciclo celular (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007; PALUNCIC et al., 2016).

Outra classe de proteínas que estão alteradas em processos cancerosos são as metaloproteinases de matriz (MMPs), cujas funções no contexto do melanoma

estão associadas aos processos de migração e invasão celular, os quais são dependentes de degradação de matriz extracelular. A atividade das MMPs, principalmente a MMP-2 e a MMP-9, estão bem descritas nos processos invasivos de células de melanoma (MORO; MAUCH; ZIGRINO, 2014). Elas são também conhecidas como gelatinases e são secretadas para o meio extracelular no início do processo de invasão das células tumorais, sendo que um aumento da expressão e secreção dessas enzimas está relacionado a um pior prognóstico do melanoma (COTIGNOLA et al., 2007). A MMP14 (MT-MMP1) é uma MMP transmembrana expressa principalmente nas células do tumor primário e estão envolvidas no estímulo da angiogênese e nos processos de migração das células endoteliais (MORO; MAUCH; ZIGRINO, 2014; YANA et al., 2007).

1.1.1.2 Tratamentos antimelanoma

Apesar dos avanços nos tratamentos, a mortalidade causada pelo melanoma é bastante elevada; no Brasil em 2015 houve 1.794 mortes e no ano de 2020 ocorrerão cerca de 8.450 (INCA, 2020), e nos Estados Unidos no ano de 2019 estima-se que ocorrerão 6.850 mortes por melanoma (ACS, 2020)

O principal tratamento contra o melanoma é a remoção cirúrgica, porém só é efetiva nos casos em que o tumor ainda não estiver na fase metastática (CHANG; KARNELL; MENCK, 1998; QUINTANILLA-DIECK; BICHAKJIAN, 2019). Porém em estágios mais avançados é necessário fazer a remoção dos focos metastáticos e remoção dos linfonodos, pois estão entre os primeiros locais de invasão do melanoma. Além da biópsia do linfonodo sentinela servir para indicar qual o estágio de progressão do melanoma (GORANTLA; KIRKWOOD, 2014; QUINTANILLA-DIECK; BICHAKJIAN, 2019), e combinar com outros tratamentos, como quimioterapia e imunoterapia (MAVERAKIS et al., 2015).

O principal agente quimioterápico para o tratamento contra o melanoma é a dacarbazina, que teve seu uso aprovado pelo FDA em 1974 e é o único quimioterápico citotóxico utilizado para o tratamento contra o melanoma maligno (BATUS et al., 2013). Porém, apesar de ser o principal fármaco, a responsividade ao tratamento é de 10% a 20% e esse composto causa muitos efeitos colaterais, como náusea, vômito, diarreia, diminui a produção de células sanguíneas, causando anemia e neutropenia, e não tem efeitos satisfatórios ao comparar os pacientes que usam e os que não usam a dacarbazina (JIANG et al., 2014).

Os tratamentos mais avançados para o melanoma são os tratamentos direcionados. Atualmente já se conhece várias vias de sinalização que geralmente estão alteradas no melanoma, e esses tratamentos vão atuar em algumas dessas vias (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007; MISHRA et al., 2018).

O Vemurafenib inibe a via de sinalização B-RAF, a qual está envolvida no crescimento e proliferação celular, sendo que esta via está alterada em aproximadamente 50% dos casos de melanoma (GONZALEZ et al., 2013). O Sorafenib é inibidor da via B-Raf e também se liga ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), podendo atuar de maneira satisfatória apenas quando administrado como adjuvante junto com a carboplatina e paclitaxel, que são agentes quimioterápicos (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007).

Os tratamentos direcionados como os descritos acima possuem uma resposta melhor quando o melanoma possui algumas dessas vias alteradas. O melanoma é classificado em quatro grupos, de acordo com as vias de sinalização que estão alteradas, podendo ser mutado em BRAF, NRAS e NF1. As células que não possuem alteração em nenhuma dessas vias são chamadas triplo negativas (DAVIS et al., 2018), como é o caso das células B16-F10 (BARBIERI et al., 2017). Também está descrito que os melanomas que não possuem mutações nessas vias apresentam um pior prognóstico para o paciente e uma maior dificuldade de tratamento (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007; PALUNCIC et al., 2016).

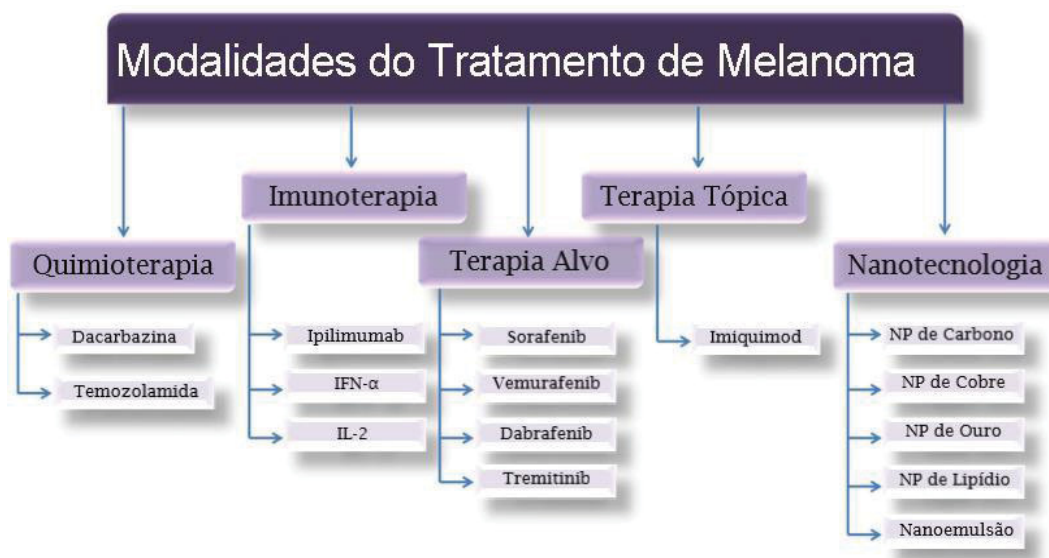
Os agentes imunoterápicos utilizados para o tratamento do melanoma são a Interleucina-2 (IL-2), o Ipilimumab, ligante de CTLA4 e os ligantes de PD-1. Porém esses tratamentos também possuem efeitos colaterais. O tratamento com IL-2 pode causar hipotensão, arritmia cardíaca, falha múltipla de órgãos reversível (BATUS et al., 2013) e o tratamento com Ipilimumab pode causar colite, endocrinopatias, hepatite e neuropatia (JOHNSON; SOSMAN, 2015).

As terapias direcionadas e imunoterapias atualmente ainda possuem um custo elevado, por exemplo no Brasil o tratamento com Ipilimumab (Yervoy) anticorpo inibidor de CTLA-4 custa cerca de 283.600 mil reais (KALIKS et al., 2019).

Recentemente tem sido estudado os efeitos de nanopartículas (NPs) para o tratamento do melanoma. As NPs podem atuar como antitumorais ou como carreadores de quimioterápicos (BAGHERI et al., 2018; CLEMENTE et al., 2018). Gonçalves e colaboradores (dados não publicados) demonstraram o efeito antitumoral de nanoesferas e nanobastões de ouro (GA-AuNSs) em concentrações não

citotóxicas. Tais nanopartículas reduziram, *in vitro*, a invasão celular e a capacidade das células de melanoma em formar colônias

FIGURA 3 – Principais Modalidades de Tratamento do Melanoma



Fonte: Adaptado de (MISHRA et al., 2018)

1.1.1.1.1 Polissacarídeos No Tratamento Do Câncer

Atualmente a pesquisa de polissacarídeos para o tratamento contra o câncer tem aumentado. Analisando a literatura é possível encontrar vários trabalhos demonstrando o efeito antitumoral desses compostos (BISCAIA et al., 2017; FANG et al., 2018; HIRA et al., 2018; HUNG et al., 2012; JIA et al., 2017; JOSEPH et al., 2013; LUO et al., 2020; MILHORINI et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2019; VARGHESE et al., 2017).

A atividade antitumoral dos polissacarídeos deve-se principalmente na redução do avanço do ciclo celular (CHEN et al., 2018a, 2018b), aumento da resposta imune (BAO et al., 2013; DEMOTTE et al., 2014) ou citotoxicidade seletiva para as células tumorais (JOSEPH et al., 2013; ZHENG et al., 2016). As principais fontes de extração desses polissacarídeos são cogumelos, algas e plantas (KHAN et al., 2019; ZONG; CAO; WANG, 2012).

Dentre alguns exemplos, uma fucogalactana extraída do cogumelo comestível *Macrocybe titans*, não citotóxica em células de melanoma murino, foi capaz de inibir a migração das células tumorais (MILHORINI et al., 2018). Extratos polissacarídicos vegetais, como o obtido do fruto *Momordica charantia*, apresentaram efeitos antitumorais *in vitro*, em câncer de próstata, diminuindo a expressão de

metaloproteinases, e em carcinoma pancreático, ativando a via MAPK e diminuindo a viabilidade das células tumorais (JIA et al., 2017).

O Grupo de pesquisa em Células Inflamatórias e Neoplásicas da Universidade Federal do Paraná tem estudado o efeito antimelanoma de polissacarídeos de diferentes fontes e com diferentes estruturas. Biscaia e colaboradores (2017) avaliaram o efeito antitumoral de uma manogalactana parcialmente metilada não citotóxica, extraída do cogumelo comestível *Pleurotus eryngii*. Também foi avaliado o efeito de uma heteroramnana sulfatada extraída da alga verde *Gayralia brasiliensis*. Esse composto não alterou a proliferação nem a morfologia celular, mas foi capaz de reduzir a invasão de células de melanoma B16-F10 (Bellan et al., 2020).

Choromanska e colaboradores (2015) demonstraram o efeito de uma β -glucana de baixo peso molecular extraída da aveia. Esse polissacarídeo demonstrou um efeito citotóxico seletivo para as células de melanoma humano (A431), porém não demonstrou toxicidade para queratinócitos não tumorais (HaCaT). A β -glucana também provocou um aumento da expressão de caspase-12 nas células de melanoma, protease está envolvida no desencadeamento da apoptose.

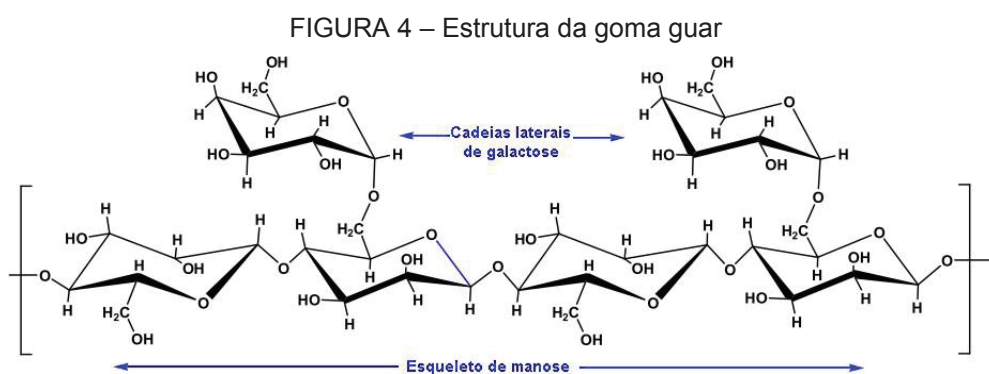
Dentre os polissacarídeos utilizados para o tratamento do câncer está a heparina (LIMA; RUDD; YATES, 2017). O uso dessa molécula na clínica começou com a descoberta de sua ação anticoagulante em 1910 e 1911 por Maurice Doyon (MULLOY et al., 2015). Há também o debate de que a descoberta foi feita por acidente pelo aluno de medicina Jay McLean (PASCHOA, 2016). Hoje em dia os principais usos para heparina e seus derivados são para a prevenção da formação de trombos e coágulos (MULLOY et al., 2015). A heparina passou a ser utilizada em pacientes oncológicos tendo em vista que uma das principais complicações, e a segunda principal causa de mortes relacionadas ao câncer, acontece devido a tromboembolismo, principalmente trombose venosa profunda e embolia pulmonar, quadro denominado Síndrome de Trousseau (SHETH et al., 2017; VARKI, 2007). Além da ação anticoagulante, verificou-se que a sobrevida dos pacientes era aumentada e estudos sobre a capacidade antimetástática desse polissacarídeo sulfatado começaram a ser realizados (BORSIG, 2010). Já foi comprovado que as heparinas e heparinas de baixo peso molecular (LMWH) podem ter efeitos antitumorais modulando o sistema imune e aumentando a resposta de células NK em câncer de mama (FLUHR; SEITZ; ZYGMUNT, 2013). Tais polissacarídeos também atuam sequestrando fatores de crescimento e, portanto, limitando a proliferação celular (LUO et al., 2011).

A goma guar (GG) é uma galactomanana (Figura 4) presente em sementes da planta *Cyamopsis tetragonoloba*, solúvel em água e com alta massa molecular (variando de 2 a 3 x 10⁶g.mol⁻¹) (GUPTA et al., 2015). A Índia atualmente é o maior produtor de goma guar tendo produzido, entre 2013 e 2014, um total de 650.000 toneladas de goma guar e, além disso, é também responsável por 80% do comércio mundial deste polissacarídeo (DAAS et al., 2002; THOMBARE et al., 2016).

A goma guar é composta por manose e galactose, em proporções que variam de 1.6:1 até 2:1 e cuja cadeia principal apresenta unidades de manose β -(1 \rightarrow 4)-ligadas e substituídas em O-6 por unidades de α -galactose (DEY, 1978; YOON; CHU; JUNEJA, 2008). Esse polissacarídeo já tem seu uso bem descrito na indústria alimentícia, sendo utilizado como aditivo, emulsificante, estabilizante, espessante e gelificante (FDA, 2019), na indústria farmacêutica como carreadores de medicamentos (BARAK; MUDGIL, 2014) e no suporte na perfuração de rochas na extração de petróleo e gás, explosivos e indústria de papel (THOMBARE et al., 2016).

Alguns estudos foram encontrados na literatura apontando suas propriedades biológicas da goma guar ou de seu derivados quimicamente modificados no câncer.

Goma guar glicosilada, e glicosilada e sulfatada aumentaram a proliferação e a capacidade fagocítica de macrófagos (RAW 264.7), além de diminuir a proliferação, de células de hepatocarcinoma (HepG2) e câncer de mama (MCF-7) (GAMAL-ELDEEN; AMER; HELMY, 2006).



A figura ilustra a estrutura padrão da goma guar. Fonte: Adaptado de (MISHRA et al., 2018)

O Davanat[®] é obtido a partir de uma hidrólise química parcial (pH 2, HCl 1N, 100°C, 2h30min) da goma guar, e com este procedimento a massa molar média da goma diminui consideravelmente de aproximadamente $2 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ para em média $48 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ (KLYOSOV, 2012; ZOMER; KLYOSOV; PLATT, 2012). O Davanat[®] pode ser utilizado em conjunto com o Fluorouracil (5-FU), um quimioterápico, com o intuito de aumentar a distribuição desse composto para as células tumorais e desta forma aumentar sua eficácia em experimentos *in vivo* (KLYOSOV; ZOMER; PLATT, 2012b).

Em estudos utilizando modelo de câncer colorretal (linhagem celular COLO 205) *in vivo*, o Davanat[®] diminuiu o crescimento tumoral e aumentou a sobrevivência dos animais e, quando administrado juntamente com o Fluorouracil, houve a potencialização do efeito inibitório no tumor (KLYOSOV; ZOMER; PLATT, 2012a). Demotte e colaboradores (2014) demonstraram que ao isolar linfócitos CD8⁺, infiltrados em tumores de pacientes, e tratá-los com Davanat[®], ocorria o aumento da expressão de interferon- γ (IFN- γ) e da toxicidade dos linfócitos, de uma maneira dose dependente.

Em estudos clínicos de fase 1 e 2 com o Davanat[®], o polissacarídeo foi administrado junto com o 5-FU, demonstrando um aumento da eficácia do tratamento, e uma diminuição de efeitos colaterais ligados diretamente ao quimioterápico (CLINICALTRIALS.GOV IDENTIFIER: NCT00388700, 2006; KLYOSOV; ZOMER; PLATT, 2012b; ZOMER; KLYOSOV; PLATT, 2012).

Estudos de interação molecular através de RMN mostraram que o Davanat[®] é um ligante de galectinas, especialmente galectina 1 (gal-1) e galectina 3 (gal-3), e que possivelmente seria este um dos mecanismos de ação antitumoral deste polímero. Foi observado também que a sua ligação em gal-1 ocorre em um sítio diferente daquele típico sítio de ligação aos β -galactosídeos, como por exemplo a lactose (KLYOSOV, 2012; MILLER; KLYOSOV; MAYO, 2009; STEGMAYR et al., 2016).

1.1.2 Galectinas como possíveis alvos moleculares de polissacarídeos antitumorais

As galectinas são proteínas que possuem um domínio de ligação para β -galactosídeos (BARONDES et al., 1994). Virtualmente todas as células expressam galectinas, porém a expressão pode variar para cada tipo celular (JOHANNES; JACOB; LEFFLER, 2018), e já foi comprovado que há uma superexpressão de galectinas 3 e 1 em tumores, e isso está relacionado com um pior prognóstico em

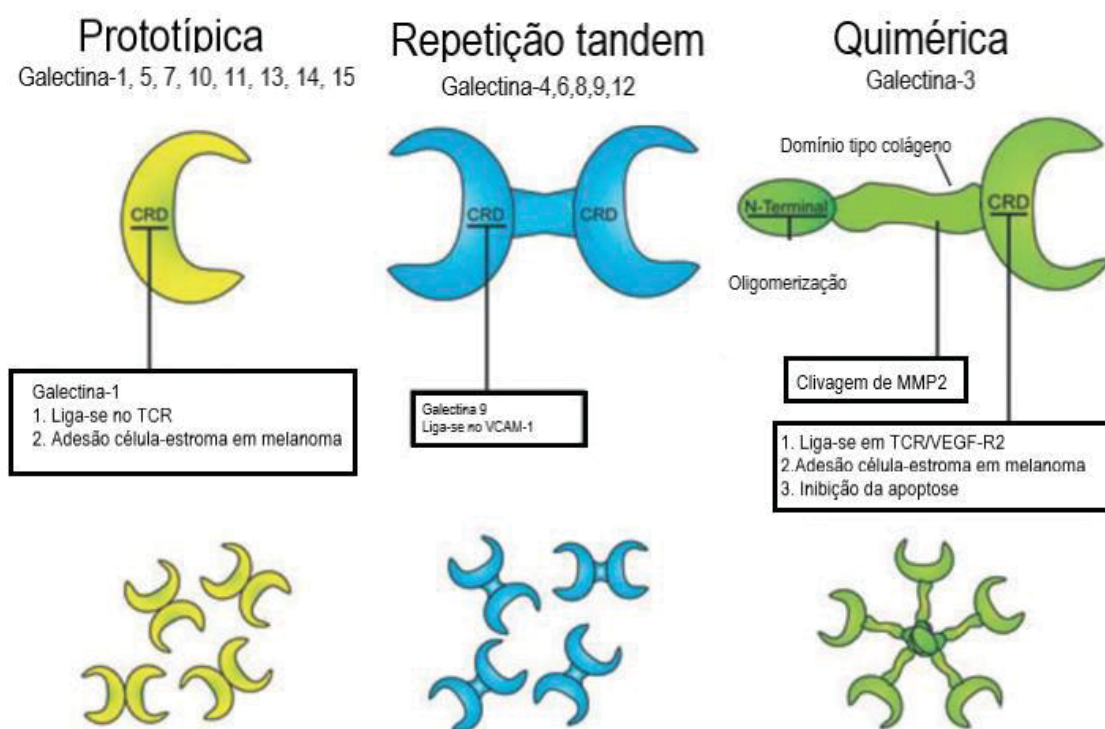
melanoma (BRAEUER et al., 2014), câncer de pulmão, próstata, mama e ovário (ASTORGUES-XERRI et al., 2014).

As galectinas não possuem a sequência sinal para serem externalizadas, essas proteínas passam a maior parte de sua vida útil no citosol ou no núcleo das células. Porém podem ser secretadas para a região extracelular por vias não clássicas, provavelmente se ligando na membrana de vesículas intracelulares, e durante o processo de exocitose, são liberadas para a matriz, sendo o controle deste processo ainda desconhecido (JOHANNES; JACOB; LEFFLER, 2018; LIU; RABINOVICH, 2005).

Existem três classes de galectinas e essas são divididas de acordo com suas estruturas (Figura 5). Algumas galectinas possuem apenas um sítio de ligação de carboidrato (CRD) e possuem a capacidade de formar dímeros, por exemplo a galectina-1. Outras podem possuir dois domínios homólogos CRDs, como a galectina-9, ou terem estruturas quiméricas, como a galectina-3, que possui um domínio CRD ligado a um domínio rico em prolina, e de maneira semelhante ao que ocorre no colágeno, a galectina-3 também é conhecida por formar um pentâmero (BRAEUER et al., 2012), por um mecanismo que ainda não é completamente conhecido (JOHANNES; JACOB; LEFFLER, 2018). Essa característica especial da galectina-3 favorece a adesão das células tumorais, tanto nas interações célula-matriz como célula-célula (BRAEUER et al., 2012; SONG et al., 2014).

Durante o processo de metástase, a galectina-3 exerce um papel importante, promovendo a agregação homotípica das células cancerosas, ou seja, aumentando a adesão célula-célula durante a passagem pela corrente sanguínea (LIU; RABINOVICH, 2005), e assim aumentando a chance das células escaparem do sistema imune (XIA et al., 2017; YOSHIOKA et al., 1998).

FIGURA 5 – Estruturas das galectinas



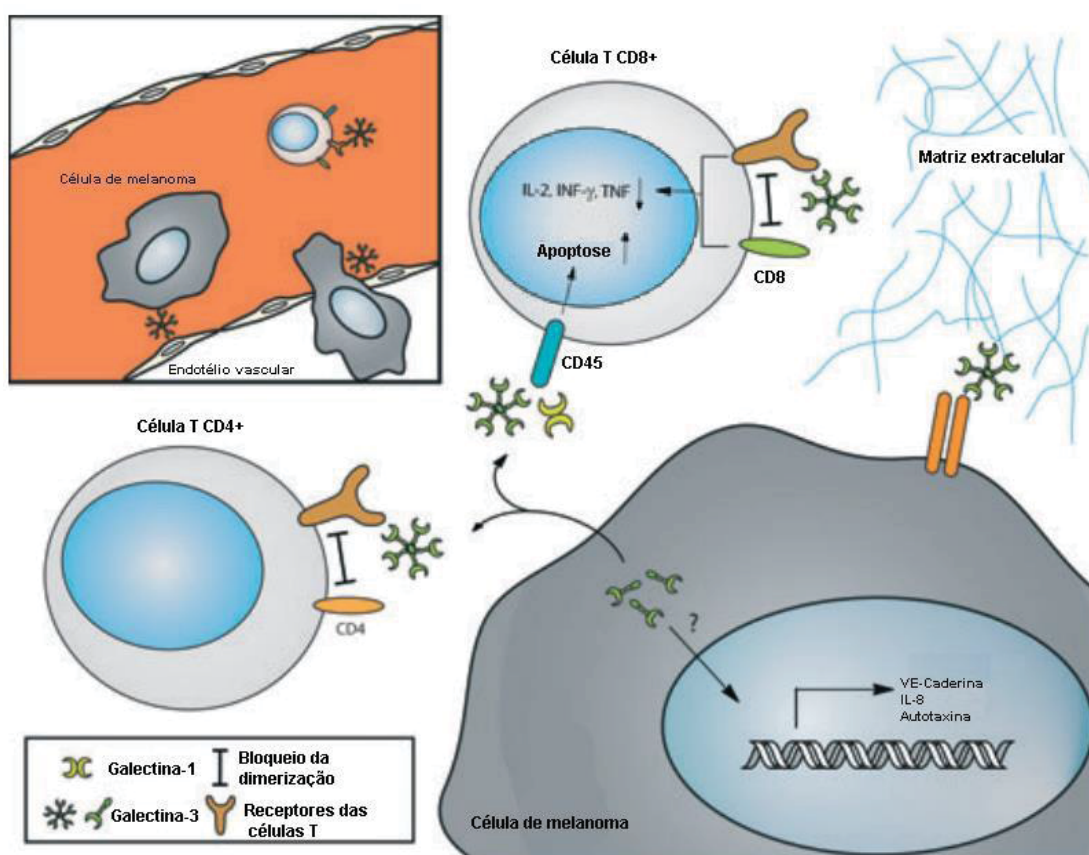
A figura ilustra os diferentes grupos de galectinas a suas estruturas. Fonte: Adaptado de (BRAEUER et al., 2012)

De acordo com a literatura, as galectinas podem interagir com múltiplos componentes celulares e da matriz extracelular, e devido a essa polivalência de interação possuem funções importantes na progressão tumoral (COUSIN; CLONINGER, 2016; LIU; RABINOVICH, 2005), como aumentar a angiogênese (NANGIA-MAKKER et al., 2000), inibir o sistema imune induzindo apoptose em células T (PERILLO et al., 1995; RUBINSTEIN et al., 2004), promover o processo de metástase, alterar as interações célula-célula e célula-matriz (ELOLA et al., 2018; LIU; RABINOVICH, 2005; TAKENAKA et al., 2003) além do seu papel na transformação celular, induzindo a via de sinalização das proteínas Ras (PAZ et al., 2001). Dessa forma tem surgido estudos que buscam ligantes inibitórios de galectinas para o tratamento antitumoral (LIU; RABINOVICH, 2005; YAO et al., 2019; YAZAWA et al., 2015).

Dentro da família das galectinas, a 1 e a 3 têm o papel na progressão tumoral e especificamente do melanoma bem descrito (ASTORGUES-XERRI et al., 2014; BROWN et al., 2012; SONG et al., 2014; YAZAWA et al., 2015). Em melanoma, câncer de mama e de pulmão foi demonstrado que a galectina-1 aumenta a defesa tumoral

contra o sistema imune, diminuindo a infiltração de células T CD4⁺ e CD8⁺, e induzindo essas células a apoptose (BANH et al., 2011). Durante o processo invasivo a galectina-1 pode favorecer esse processo, aumentando a adesão das células cancerosas com o endotélio vascular (CLAUSSE et al., 1999). A galectina-3 tem um papel tanto pró quanto antitumoral, uma vez que quando ela se encontra no citoplasma ela possui uma ação pró-tumoral, e no núcleo uma ação antitumoral (CALIFICE et al., 2004; VAN DEN BRÛLE et al., 2000). Quando no meio extracelular, a galectina-3 pode interagir com glicoproteínas e fatores de crescimento, atuando a favor do tumor (Figura 6). (JOHANNES; JACOB; LEFFLER, 2018; LIU; RABINOVICH, 2005)

FIGURA 6 – Influência das galectinas 1 e 3 no microambiente tumoral



Intracelularmente a galectina-3 pode aumentar a expressão de proteínas, como a VE-caderina, IL-8 e autotaxina, associadas a progressão tumoral. No ambiente extracelular tanto a galectina 1 como a 3 podem atuar reduzindo a infiltração de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. A galectina 3 também favorece o processo de metástase aumentando a adesão entre as células cancerosas e o endotélio vascular, e inibindo a ativação de linfócitos presentes na corrente sanguínea. Fonte: Adaptado de (BRAEUER et al., 2012)

Alguns outros polissacarídeos, além do DAVANAT®, possuem sua ação antitumoral mediada por galectinas. Em melanoma B16-F10, mesmo modelo tumoral utilizado no presente trabalho, pectinas extraídas do milho diminuíram a adesão e a migração celular de maneira mediada por gal-3. Experimentos *in vivo* utilizando pré-tratamento de animais com tais pectinas mostraram uma redução de metástase

pulmonar quando células de melanoma foram injetadas pela veia caudal (JAYARAM; KAPOOR; DHARMESH, 2015). Thijssen e colaboradores (2010) descreveram que quando há uma maior expressão e secreção de gal-1 pelas células B16-F10, há um aumento da interação entre a gal-1 e VEGF, fator de crescimento do endotélio vascular, estimulando a angiogênese na região tumoral.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

O objetivo geral desse trabalho foi produzir derivados parcialmente hidrolisados e sulfatados a partir da goma guar, bem como avaliar seus efeitos antitumorais *in vitro* sobre células de melanoma murino B16F10.

1.2.2 Objetivos específicos

- 1- Obter os polissacarídeos a serem testados através de hidrólise ácida parcial (GGH) e posterior sulfatação (GGHS) da goma guar bem como caracterizar tais polímeros;
- 2- Avaliar se os polissacarídeos GGH e GGHS alteram a viabilidade e a proliferação de células tumorais da linhagem B16F10 e de fibroblastos de linhagem não tumoral Balb c/3T3;
- 3- Investigar se GGH e GGHS alteram a morfologia das células tumorais;
- 4- Analisar se as células expostas a GGH e GGHS apresentam alteração em processos celulares relacionados à malignidade tumoral (perfil clonogênico, migração e invasão);
- 5- Avaliar se os polissacarídeos testados se ligam às galectinas 1 e 3.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção e caracterização dos polissacarídeos

Os polissacarídeos utilizados neste trabalho foram sintetizados de acordo com Barddal et al. (2020). Para isso, 5 g de goma guar foram submetidos hidrólise ácida parcial com ácido trifluoroacético (TFA) 0,5 M a 100 °C durante 2h. Após neutralização a mistura foi exaustivamente dialisada (membranas com limite de exclusão de 6-8 KDa, SpectraPor®) contra água destilada e posteriormente liofilizada, obtendo-se o polissacarídeo parcialmente hidrolisado (0,822 g) denominado de GGH. O procedimento de sulfatação química foi realizado conforme descrito por Larm et al. (1979). Um total de 150 mg de GGH foram solubilizados em N,N-dimetilformamida (15

mL) sendo posteriormente adicionado o complexo piridina-sulfato (7,84g), em uma relação de 18 moles de piridina-sulfato para cada mol de OH livre de GGH. A mistura reacional foi mantida a 25 °C durante 6h sob agitação magnética. Decorrido este tempo a reação foi interrompida pela adição de NaHCO₃ até pH 7, dialisada (membranas com limite de exclusão de 12-14 kDa SpectraPor®) e liofilizada, obtendo-se o polissacarídeo hidrolisado e sulfatado denominado de GGHS (261 mg). A homogeneidade e massa molar foi avaliada por HPSEC-MALLS-RI. Para isso, 2 mg dos polissacarídeos GGH e GGHS foram diluídos em 1 ml de NaNO₂ 0,1 M. O eluente, NaNO₂ 0,1 M com NaN₃ a 0,02 % (m/v), foi administrado na coluna através de uma bomba peristáltica WATERS 515. Foram utilizadas quatro colunas WATERS Ultrahydrogel dispostas de forma sequencial e apresentando diferentes limites de exclusão: 7×10^6 (coluna 2000); 4×10^5 (coluna 500); 8×10^4 (coluna 250) e 5×10^3 (coluna 120). Os resultados foram analisados utilizando o software ASTRA 4.70.07.

O grau de sulfatação foi calculado de acordo com o método turbimétrico de gelatina-bário (Dodgson e Price., 1962). Para isso o polissacarídeo GGHS foi hidrolisado em uma solução de ácido clorídrico (HCl) 1N na temperatura de 110 °C durante 5 horas; 200g de gelatina foram diluída em 40 mL de H₂O, em banho-maria a 60 °C vagarosamente até dissolver e a solução foi armazenada overnight na geladeira. No dia seguinte foram adicionados 200 mg de cloreto de bário (BaCl₂), sob agitação magnética e após a dissolução total do BaCl₂ a solução foi armazenada em geladeira durante 3 horas. Para o curva padrão foi utilizado o sulfato de sódio (Na₂SO₄) nas concentrações de 30; 60; 90; 120; 150 e 180 mg/mL. A quantificação de sulfato foi realizada no leitor de microplacas (BioTek® Instruments, Inc., Winooski, United States) a 420 nm. A porcentagem de enxofre foi calculada a partir da absorbância, que representa a quantidade de sulfato inorgânico nas amostras. O grau de substituição (DS) foi calculado com a fórmula $DS = (Mm \times S\%)/(3200 - 102 \times S\%)$ (HUSEMANN, 1965).

Os espectros de RMN-HSQC editado foram obtidos com o equipamento Bruker 400 MHz AVANCE III NMR. Os polissacarídeos foram diluídos em uma concentração de 60 mg/mL em água deuterada (D₂O) e as análises foram feitas à temperatura de 50 °C. Os assinalamentos químicos foram expressos em δ (ppm) em relação ao assinalamento padrão do hidrogênio da água (δ 4.34).

Como os procedimentos utilizados para produção dos polissacarídeos deste estudo são, ambos, métodos de modificação química, é importante verificar se eles são reprodutíveis tanto em produzir moléculas similares estruturalmente quanto em

relação às suas propriedades biológicas. Em vista disso, a amostra GGHSB similar a GGHS, produzida e caracterizada por Barddal et al. (2020) foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani e pela Dra. Helyn Priscila De Oliveira Barddal do Departamento de Bioquímica da UFPR com o intuito de permitir a comparação da resposta biológica de diferentes lotes do mesmo polímero.

As concentrações a serem testadas dos polissacarídeos foram selecionadas a partir de experimentos realizados em fibroblastos, células de linhagem não tumoral conforme sugerido pelo protocolo ICCVAM (ICCVAM, 2006). Brevemente, esse protocolo sugere utilizar a máxima concentração solúvel de um composto, neste caso foi de 5 mg/mL, e a partir dessa solução mãe realizar oito diluições seriadas de 1:10, e avaliar a citotoxicidade causada pelo polissacarídeo em cada concentração preparada, pela metodologia do vermelho neutro. Esse protocolo foi desenvolvido como estratégia para diminuir a utilização de animais em testes de previsão de efeitos citotóxicos de novos compostos, e dessa forma poder prever a partir de experimentos *in vitro* as doses de partida para os testes *in vivo*. As soluções-mãe de GGH, GGHS e GGHS1 foram diluídas em meio DMEM sem SFB e posteriormente esterilizadas por filtro de seringa de 0,22 µm.

2.2 Linhagens e cultivo celular

Foram utilizadas as células de melanoma murino B16-F10 (ATCC® BCRJ, 0046) e fibroblastos BALB/3T3 clone A31 (ATCC® CCL-163™). As células foram mantidas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco), 1,5 g/L de bicarbonato de sódio, e com os antibióticos 1 U/mL de penicilina e 1 µg/mL de estreptomicina (Life Technologies) a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

Os subcultivos foram realizados após as células atingirem a confluência máxima de 80% da área de cultivo, utilizando tripsina-EDTA (Gibco). Para a realização dos experimentos as células foram soltas com EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético; Gibco) a 2 mM em PBS por 3 minutos a 37°C.

Para os experimentos, as células foram plaqueadas e, 24h após plaqueamento, expostas aos polissacarídeos durante 72h.

2.3 Avaliação de viabilidade e proliferação celular

Com o intuito de avaliar se os polissacarídeos alteravam a viabilidade celular foi utilizado o ensaio de vermelho neutro (BORENFREUND e PUERNER, 1985;

REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008), pois é um experimento de baixo custo e simples e amplamente empregado para a detecção da citotoxicidade de novos compostos (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008). Esse ensaio já foi validado na linhagem de fibroblastos murinos Balb/c 3T3, para predizer doses a serem utilizadas em ensaios *in vivo* e assim minimizar o uso de animais (ICCVAM, 2006). O método consiste em avaliar a capacidade da célula em reter o vermelho neutro (corante catiônico lipofílico) dentro de vesículas ácidas. No interior destas vesículas, onde o pH é próximo de 5, ocorre a protonação do corante e, portanto, este perde sua capacidade de atravessar livremente a membrana ficando, portanto, retido.

Neste experimento, 400 células da linhagem B16-F10, e 2000 células de Balb c/3T, foram cultivadas em placa de 96 poços (Sarstedt), 24h após plaqueamento, expostas aos polissacarídeos, nas concentrações de 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 e 100 µg/mL, durante 72h e, após o tratamento o meio de cultura foi retirado e as células foram incubadas (37°C e 5% de CO₂) por duas horas com 100 µL do vermelho neutro (Sigma) (0,04 mg/mL, em meio de cultura). Posteriormente o meio de cultura foi removido e uma solução de extração do corante contendo álcool etílico:H₂O:ácido acético glacial (50:49:1 v/v/) foi adicionada às células (100 µL / poço). Após homogeneização, a absorbância de cada poço da placa foi medida em 540 nm em leitor de microplacas (BioTek® Instruments, Inc., Winooski, United States).

Para medir a densidade celular foi utilizado o método de coloração com cristal violeta, em protocolo adaptado de Gillies et al, 1986. O experimento foi feito nas células fixadas com a solução de extração do vermelho neutro. Após a leitura de absorbância do vermelho neutro, os sobrenadantes das culturas foram retirados e as células foram lavadas com água destilada e incubadas por 20 minutos, em temperatura ambiente, com 100 µl da solução de cristal violeta diluído em água ultrapura na concentração de 0,25 mg/mL. Em seguida, a placa foi lavada uma vez com água destilada e o corante foi eluído com 100 µL por poço de ácido acético a 33% (v/v) em água ultrapura e a absorbância mensurada em 570 nm no leitor de microplacas (BioTek® Instruments, Inc., Winooski, United States). Tanto para o ensaio de viabilidade quanto o ensaio de proliferação por cristal violeta foram realizados 4 experimentos independentes com 4 replicatas técnicas cada.

Outro método utilizado para inferir sobre a influência dos polissacarídeos na proliferação celular foi a contagem celular. Para isso 12.000 células B16-F10 foram plaqueadas em placas de 6 poços (Sarstedt), e 24h após plaqueamento expostas aos polissacarídeos durante 72h. As células foram soltas com 2 mM de EDTA em PBS

durante 5 minutos. As células foram ressuspensas em DMEM com 10% de SFB, e contadas em câmara de Neubauer. Em seguida as células foram utilizadas para a realização dos experimentos de análise da morte celular ou formação de colônias, como descrito nos itens 2.4 e 2.5, respectivamente.

2.4 Análise de morte celular por citometria de fluxo

Para este ensaio foram seguidas as recomendações do fabricante para o kit de detecção de apoptose por iodeto de propídio (PI) e Anexina V (BD Pharmingen, 559763). Doze mil células B16-F10 foram plaqueadas em cada poço em placas de 6 poços (Sarstedt). Posteriormente foram adicionados os tratamentos na concentração de 100 µg/mL. Após o período de tratamento, os sobrenadantes foram recolhidos e reservados. Isto foi feito para recuperar as células que, porventura, estivessem desaderidas do fundo da placa durante o período de tratamento. As células aderidas foram soltas com EDTA 2mM em PBS por 5 minutos e misturadas com seus respectivos sobrenadantes previamente reservados. As células foram centrifugadas e ressuspensas em PBS, contadas em câmaras de Neubauer, e 500.000 células foram separadas em tubos para citometria de fluxo. As células foram ressuspensas em 100 µL de tampão de ligação da Anexina V, diluído 1:10 em PBS, junto com 2.5 µL de Anexina V e 5 µL de PI. As células foram incubadas por 15min em câmara escura em gelo. A Anexina V é um ligante de fosfatidilserina, um fosfolípido de membrana que em células viáveis está voltada para o citoplasma celular, porém ao decorrer do processo de apoptose é transportada para a porção voltada para o meio extracelular. O PI é um intercalante de DNA, que entrará na célula caso haja algum dano na membrana, o que ocorre em processos necróticos. Após a incubação foram adicionados 400 µL do tampão de ligação. As amostras foram então analisadas por citometria de fluxo, em equipamento FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company, BD) onde foram adquiridos 20.000 eventos por grupo. A Anexina V foi excitada com laser 488 nm e o sinal foi coletado no canal FL-1, enquanto o PI foi excitado com laser 488 nm e o sinal foi coletado no canal FL-3. Como controle positivo de apoptose, as células foram incubadas com 10 µM de camptotecina durante as últimas 18 horas de cultivo, e, para o controle positivo da necrose, as células foram incubadas com Saponina 0,01% em PBS por 30 minutos antes do processamento.

2.5 Avaliação da capacidade clonogênica

Para verificar a capacidade clonogênica 400 células B16-F10 foram plaqueadas em placas de 6 poços (Sarstedt), e os polissacarídeos GGH e GGHS foram adicionados aos poços na concentração de 100 µg/mL. As células foram mantidas em cultura por 96h. Após este tempo, os poços foram lavados com PBS, e as células fixadas com álcool etílico, água destilada e ácido acético glacial (50:48:2 v/v). Os poços foram novamente lavados com PBS, e corados com cristal violeta 0,25 mg/mL por 30 minutos, conforme descrito por Franken e colaboradores (2006).

Após a coloração, os poços foram lavados com água destilada. O tamanho e a quantidade de colônias formadas foram avaliados através de fotografias que foram analisadas com o *software* Fiji ImageJ (SCHINDELIN et al., 2009).

2.6 Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal

Com o objetivo de avaliar se os tratamentos alteravam a morfologia celular, as células B16-F10 foram cultivadas em placas de 24 poços (Sarstedt), sobre lamínulas circulares de vidro (Knittel Glass); as células também foram cultivadas sobre lamínulas com o revestimento de matrigel®, para isso, um dia antes do plaqueamento das células, 200 µL de uma solução contendo 20 µg/mL de matrigel® em DMEM sem SFB foi colocado sobre as lamínulas. Após o tratamento com GGH e GGHS na concentração de 100 µg/mL por 72h, as células foram lavadas uma vez com tampão cacodilato de sódio (0,1M, pH 7,2), e fixadas em uma solução contendo glutaraldeído 2,5% no mesmo tampão, por 1 hora. As células foram novamente lavadas com tampão cacodilato (0,1 M, pH 7,2), e pós-fixadas com tetróxido de Ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio (0,1M pH 7,2) no escuro durante 30 minutos, para melhor preservação da estrutura da membrana celular. Após a fixação, as células foram lavadas novamente com tampão cacodilato e desidratadas em concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e duas vezes com 100%, v/v) por 10 minutos em cada concentração. Posteriormente as células foram submetidas ao ponto crítico de CO₂ no aparelho CPD 010 (Critical Point Dryer) 030 (Balzers), metalizadas com ouro metálico no aparelho SCD 030 (Balzers) e então analisadas no microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM 6360 – LV SCANNING ELECTRON MICROSCOPE). As imagens foram capturadas nos aumentos de 200 e 800 vezes.

Para a microscopia confocal as células B16-F10 foram cultivadas em placas de 24 poços (Sarstedt), sobre lamínulas circulares de vidro (Knittel Glass). Após o

tratamento com GGH e GGHS na concentração de 100 µg/mL por 72h, as células foram lavadas uma vez com PBS 37 °C, e fixadas com PFA 2% em PBS durante 30 minutos. As células foram coradas com 50 µl por lamínula de uma solução contendo DAPI (Thermo Fischer) (1 µg/mL), uma gota a cada 2 ml de faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (ActinGreen™ 488 ReadyProbes™ Reagent, Thermo Fischer) em PBS contendo 0,01 % de saponina e por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a marcação, as lamínulas foram montadas com 10 µl de Fluormount G (17984-25, E.M.S). As imagens foram obtidas utilizando o sistema de microscopia de varredura a laser confocal A1R MP+ (Nikon) e analisadas utilizando o software Fiji ImageJ (SCHINDELIN et al., 2009).

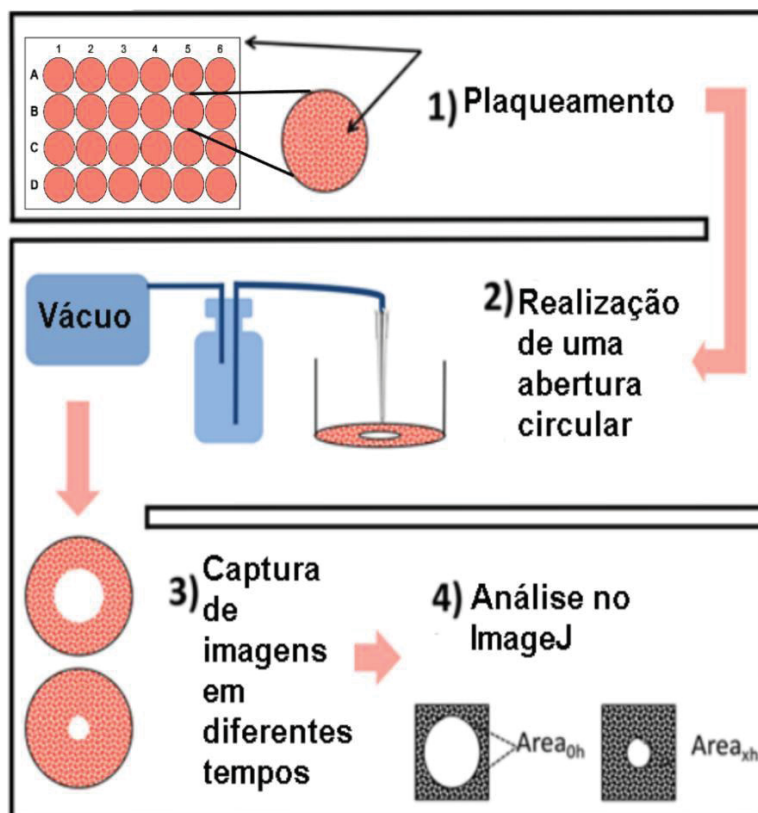
2.7 Migração celular

Assim como no ensaio clonogênico, para avaliar se os polissacarídeos alteravam a capacidade migratória das células foram utilizadas duas abordagens experimentais. Em uma delas as células eram previamente tratadas com os polissacarídeos e posteriormente submetidas ao processo de migração celular, na ausência dos polissacarídeos. No outro delineamento experimental, os tratamentos foram adicionados às células de maneira simultânea ao tempo em que elas migraram. Com a primeira abordagem o intuito do experimento foi observar se os compostos modulavam ou reprogramavam as células. Já na segunda abordagem o objetivo era inferir sobre o papel dos polissacarídeos no processo de migração independente de reprogramação celular.

O protocolo de migração celular utilizado foi adaptado de De Ieso e Pei (2018). Após plaqueamento das células em placas de 24 poços (160.000 céls/poço; pré-tratadas ou não com os polissacarídeos GGH e GGHS n concentração de 100 µg/mL por 72h), as células permaneceram em repouso durante 16h para adesão celular, após este período, as células foram expostas a mitomicina a 10 µg/mL por 2 horas na incubadora à 37°C com 5% de CO₂. A mitomicina é um inibidor de proliferação e por isso é importante para bloquear a divisão celular para que possa ser avaliado somente a migração celular. Após esse período, foi realizado uma abertura circular, com o auxílio de uma ponteira de 10 µl acoplada a uma bomba à vácuo (Figura 7). Após esse passo, os poços foram lavados com meio DMEM sem SFB, e foi adicionado meio DMEM com 3% de SFB. Os poços foram fotografados em dois tempos, no início do experimento (denominado tempo 0) e após 21h de incubação (denominado tempo 21), em microscópio de luz Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) acoplado

a sistema de captação de imagens AxioCam MRc (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). As imagens obtidas com o software AxioVision na objetiva de 5x foram analisadas pelo software Fiji ImageJ, de onde obteve-se a área dos espaços livres de células de cada poço de cultura nos dois tempos. O cálculo da % de migração foi realizado utilizando a fórmula: $100 - ((\text{Área Final} / \text{Área Inicial}) \times 100)$.

FIGURA 7 –Desenho experimental do ensaio de migração celular



Desenho esquemático do ensaio de migração celular. Fonte: Adaptado de (DE IESO; PEI, 2018)

2.8 Invasão Celular

As células B16-F10 foram pré-tratadas em placas de 6 poços (Sarstedt) (12.000 células por poço) com os polissacarídeos GGH e GGHS na concentração de 100 µg/mL durante 72 horas, soltas com EDTA 2mM em PBS durante 5 minutos, e ressuspensas em meio de cultura DMEM sem SFB. Posteriormente foram plaqueadas 80.000 células em insertos com membranas de policarbonato com poros de 8 µm (Thincert Cell Culture Insert For 24 Well Plates - 662638, (Greiner), revestidos com 35 µl de Matrigel® (2,5 mg/mL), em placas de 24 poços. Por fora do inserto, nos poços, foi adicionado meio de cultura DMEM contendo 10% de SFB, cuja função é de agir como quimioatratante para as células para invadirem o inserto. As placas foram incubadas por 72 horas a 37°C e 5% de CO₂ e após este período, os insertos foram fixados com paraformaldeído 2% v/v em PBS por 30 minutos. As células foram

coradas com 50 µl de uma solução contendo DAPI (Thermo Fischer) (1 µg/mL), uma gota do marcador de faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (ActinGreen™ 488 ReadyProbes™ Reagent, Thermo Fischer) a cada 2 mL em PBS contendo 0,01% de saponina e por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente as células que não atravessaram o Matrigel® foram removidas com o auxílio de um cotonete, os insertos foram cortados com o auxílio de um bisturi, e as lâminas foram montadas com Flouromount G, com as células que invadiram o inserto voltadas para cima (GONÇALVES et al, dados não publicados).

A obtenção das imagens foi realizada utilizando o microscópio de fluorescência Axio Imager Z2 (Carl Zeiss), equipado com software de captura automatizada Metafer 4/VSlide (Metasystems), na objetiva de 20x. A análise consistiu na contagem do número de células (utilizando a marcação dos núcleos) e esse número foi dividido pela área do inserto, com a utilização do software Fiji ImageJ.

2.9 Adesão celular

Para o ensaio de adesão foi feita a sensibilização dos poços de uma placa de 96 poços com 50 µL de matrigel®, em uma concentração de 20 µg/mL em PBS, overnight a 4°C. Como controle, alguns poços permaneceram sem nenhum revestimento.

As células de B16-F10 foram pré-tratadas em placas de 6 poços (Sarstedt) (12.000 células por poço) com os polissacarídeos GGH e GGHS na concentração de 100 µg/mL durante 72 horas, e então foram soltas com EDTA 2mM em PBS por 5 minutos, e ressuspensas em DMEM com SFB. Após a contagem, 24.000 células foram plaqueadas em cada poço e ficaram por 2 horas e 30 min na incubadora a 37°C e 5% de CO₂. Os poços foram lavados 1 vez com PBS a 37°C e as células aderidas foram fixadas com 100 µl de uma solução contendo álcool etílico, água destilada e ácido acético glacial (50:48:2 v/v) por 20 min. Após lavagem com água destilada as células aderidas foram coradas com 100 µl de cristal violeta (0,25 mg/mL) por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o excesso de corante foi retirado através de lavagem com água destilada e corante do interior das células foi eluído com 100 µL de ácido acético 33% (v/v). A absorbância, que será tanto maior quanto maior for o número de células presentes no poço, foi mensurada em leitor de microplacas (BioTek® Instruments, Inc., Winooski, United States) no comprimento de onda de 570 nm (KHALILI; AHMAD, 2015).

2.10 Análise de ciclo celular

Células B16-F10 foram plaqueadas em placas de 6 poços (Sarstedt) (18.000 células por poço) e permaneceram, durante 24h, em meio de cultura DMEM sem SFB com o objetivo de sincronizar o ciclo celular (KHAMMANIT et al., 2008). Após esse período, 10% de SFB foi adicionado aos poços. As células foram então expostas aos polissacarídeos a 100 µg/mL durante 72 horas. Após este tempo, as células foram desaderidas da placa com EDTA 2mM em PBS durante 5 minutos e transferidas para tubos falcon de 15ml, centrifugadas e ressuspensas em PBS para lavagem, duas vezes. Após as lavagens, as células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) 2% v/v em PBS por 30 minutos. As células foram centrifugadas e ressuspensas em PBS, e após esse passo foram mantidas a -20°C por no mínimo 24 horas em uma solução de álcool etílico 70% para permeabilização.

No dia da análise por citometria de fluxo, as células foram retiradas do freezer, centrifugadas e lavadas com PBS por duas vezes. Posteriormente foram incubadas com 1 mL do kit comercial de marcação PI/RNase (catálogo número 550825, BD Pharmingen) por 20 minutos. O kit possui RNase que degrada RNA, dessa forma, o material intercalado pelo iodeto de propídio (PI) corresponde unicamente ao conteúdo de DNA. Foram capturados 20.000 eventos por grupo no citômetro de fluxo FACSVerse™ (Becton, Dickinson and Company, BD), com o laser 488 e no filtro 586/42. Os dados foram analisados com o software Flowing.

2.11 Avaliação da expressão de galectina-3 em células B16-F10

Para avaliar se as células B16-F10 expressavam galectina-3 foram realizadas análises preliminares em microscopia de varredura a laser confocal. Para tanto, 3.300 células B16-F10 foram cultivadas em placas de 24 poços (Sarstedt), sobre lamínulas circulares de vidro (Knittel Glass). Após o cultivo durante 96h, as células foram lavadas uma vez com PBS 37 °C e fixadas com PFA 2% em PBS durante 30 minutos. As células foram então incubadas com Glicina 0,1M em PBS, para bloqueio dos radicais aldeídos e então foram permeabilizadas e bloqueadas com uma solução de PBS contendo 1% de BSA e 0,01% saponina, por 20 minutos. A seguir, as células foram incubadas com o anticorpo primário anti-galectina-3 (hibridoma M3/38) diluído em PBS contendo 1% de BSA e 0,01% saponina durante 1 hora em temperatura ambiente. As células foram então lavadas 3 vezes com PBS contendo 0,01% de saponina, e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de rato conjugado com FITC (Jackson 112095003) por 40 minutos a temperatura ambiente. Esse anticorpo

foi diluído em PBS contendo 0,01% de saponina e DAPI (Thermo Fischer) (1 µg/mL), para marcação dos núcleos e duas gotas a cada 2 ml de faloidina conjugada com Alexa Fluor 555 (ActinRed™ 555 ReadyProbes™ Reagent, Thermo Fisher). Após a marcação descrita acima, as lâminas foram montadas adicionando as lamínulas com as células voltadas para a lâmina e fixadas nesta com 10 µl de Flouromount G (17984-25, E.M.S). As imagens foram obtidas utilizando o sistema de microscopia de varredura a laser confocal A1R MP+ (Nikon) e analisadas utilizando o software Fiji ImageJ (SCHINDELIN et al., 2009).

2.12 Análise da ligação dos polissacarídeos nas galectinas 1 e 3 por micro balança de quartzo (QCM-D)

A análise da interação dos polissacarídeos GGH e GGHS com galectinas (1 e 3) foi realizada no equipamento QCM-D (micro balança de cristal de quartzo) e em colaboração com a Dra. Stelée Biscaia (pós-doutoranda do PPG em Biologia Celular e Molecular UFPR) e Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas do Departamento de Química da UFPR. Neste, é utilizado um sensor de ouro, no qual são imobilizadas as galectinas (1 ou 3) (cada uma em um sensor). Para a imobilização das galectinas, os sensores são primeiramente submetidos a uma limpeza por luz UV, para eliminação de micro-organismos e hidrocarbonetos e, então à solução de “piranha básica” (H₂O, hidróxido de amônio e peróxido de hidrogênio 5:1:1 v/v) a 75 °C por 5 minutos. Após limpeza, os sensores foram lavados exaustivamente com H₂O ultrapura. Os sensores foram então deixados durante 16h em uma solução de β-mercaptopetanol 0,05 M (Sigma M3148) para a ligação do grupamento tiol ao ouro e deixando uma hidroxila livre para a próxima ligação. No dia seguinte os sensores foram lavados com etanol absoluto e foi realizada a oxidação pelo reagente TEMPO (SIGMA CAT 214000), para oxidar o β-mercaptopetanol e transformá-lo em β-mercaptopropionóico, inserindo uma carboxila em sua estrutura. Tal carboxila é modificada pelos reagentes EDC 100 mM (N-(3-Dimethylaminopropyl) -N'-ethylcarbodiimide hydrochloride) (Sigma CAT E7750) e NHS 400mM (N-Hydroxysuccinimide) (Sigma CAT 130672). Posteriormente os sensores foram revestidos com 100 µL da solução de galectina 1 ou 3 (100 µg/mL) e mantidos em repouso durante 16h a 4°C.

No dia do experimento, os sensores foram colocados no equipamento QCM e as soluções dos polissacarídeos (GGH 100 µg/mL e GGHS 1000 µg/mL) são ofertadas por um sistema de fluxo contínuo promovido por bomba automatizada com vazão de 100 µL/min (KD Scientific). As interações foram então mensuradas através da análise

da adsorção/dessorção de massa em tempo real com altíssima sensibilidade (ng.cm^{-2}). Solução de lactose a $100 \mu\text{g/mL}$ foi utilizada como controle positivo. Os dados extraídos do QCM-D foram então analisados pelo Software QSense DFind.

2.13 Análises estatísticas

Todos os experimentos descritos foram repetidos de maneira independente no mínimo três vezes. Em cada um dos experimentos foi feito pelo menos quadruplicatas.

Para análise estatística dos dados foi realizado inicialmente um teste de normalidade nas amostras, e, caso os dados fossem normais, era utilizado o teste-t Students. Caso a distribuição dos dados não fosse normal foi realizado o teste-t não paramétrico e não pareado de Mann-Whitney. Para a comparação estatística onde os dados foram normalizados em relação aos dados do grupo controle foi utilizado o teste t paramétrico não pareado com a correção de Welch. Foi considerado estatisticamente significativo as diferenças entre grupos com o nível de significância de $p < 0.05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização dos polissacarídeos

Os polissacarídeos GGH e GGHS foram satisfatoriamente obtidos com características estruturais, de massa molar e perfil de sulfatação semelhante ao que foi previamente realizado por Barddal e colaboradores (2020), indicando a reprodutibilidade do método de síntese proposta pelos referidos autores. Os valores de massa molar estimados foram de 2.620 g.mol^{-1} para GGH e de $14.296 \text{ g.mol}^{-1}$ para GGHS. No caso do polissacarídeo sulfatado, o grau de substituição por grupamentos sulfato foi de 1,9, ou seja, para cada monossacarídeo existe, em média, 1,9 grupamentos sulfato. Os espectros bidimensionais de RMN-HSQC, bem como os perfis de eluição dos polissacarídeos em HPSEC-RI, bem como as conclusões acerca da caracterização estrutural dos lotes de GGH e GGHS utilizados neste trabalho estão mostrados no ANEXO 1.

3.2 Influência dos polissacarídeos na viabilidade, proliferação e morte celular

Os quimioterápicos citotóxicos têm sido a principal linha de tratamento do melanoma por mais de 30 anos, porém atualmente tem sido substituídos por terapias alvo e imunoterapias, ou a combinação dessas modalidades de tratamento (JIANG et

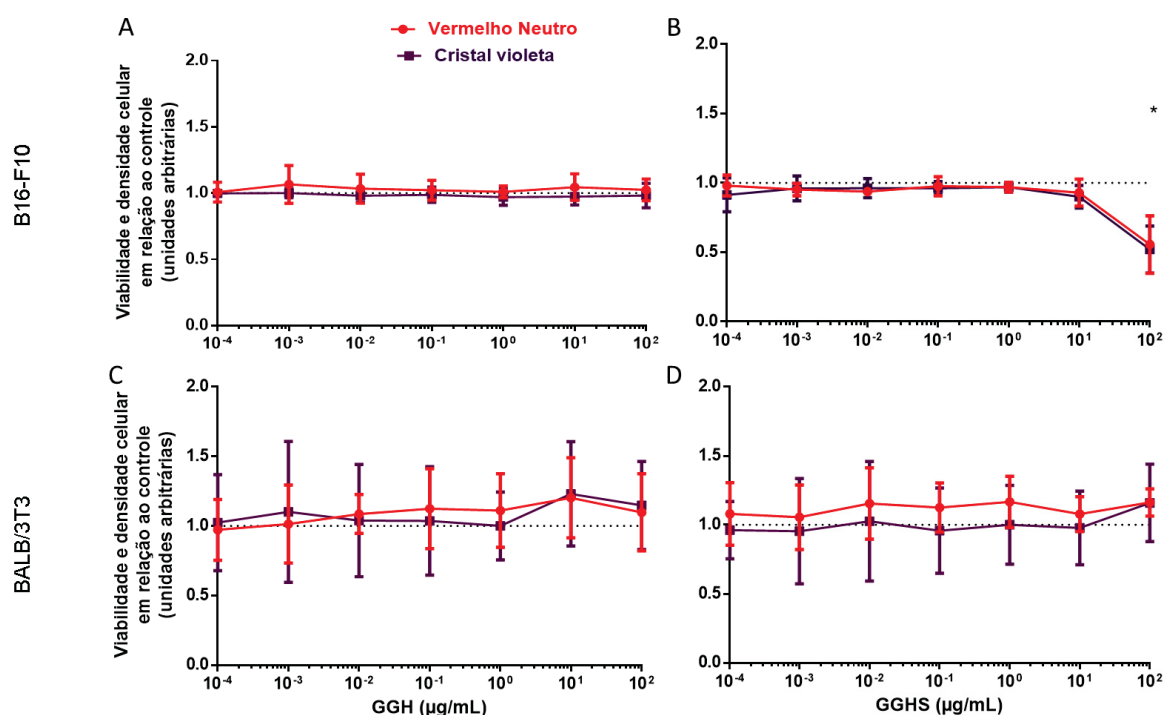
al., 2014; SIMON; KOURIE; KERGER, 2017). Essa mudança de paradigma é importante tendo em vista os resultados obtidos na clínica. A dacarbazina, por exemplo, quimioterápico de escolha pelo SUS no tratamento de melanoma, tem uma taxa de resposta de apenas 10-20% (BATUS et al., 2013).

Após a realização dos experimentos, os dados obtidos nos ensaios de vermelho neutro e cristal violeta estão apresentados na Figura 8. Observando os dados relacionados ao polissacarídeo não sulfatado GGH (Fig. 8A e 8C) observa-se que este não alterou a viabilidade celular nem a proliferação celular em nenhuma das concentrações testadas, tanto na linhagem das células tumorais de melanoma, quanto nas células normais testadas (fibroblastos). Em contrapartida, o polissacarídeo sulfatado GGHS, na concentração de 100 µg/mL, diminuiu a proliferação de células de melanoma (Fig.8B) mas não diminuiu a proliferação, nem a viabilidade de fibroblastos (Fig. 8D). Com o intuito de confirmar o resultado de cristal violeta foi realizada uma contagem de células nos grupos controle e grupos tratados com GGHS, após 72h de exposição, e o resultado está de acordo com o obtido no ensaio de cristal violeta, como pode ser observado na Figura 9.

Com o intuito de investigar a reprodutibilidade biológica de diferentes lotes da goma guar hidrolisada e sulfatada, os ensaios de vermelho neutro e cristal violeta, foram realizados com o lote adquirido por Barddal e colaboradores (2020), FIGURA Suplementar 3. Na concentração de 100 µg/mL o polissacarídeo GGHS também levou a uma redução da proliferação das células de melanoma mas não diminuindo a viabilidade, mostrando que há uma reprodutibilidade biológica entre os diferentes lotes utilizados.

Para investigar se a diminuição da proliferação celular observada nas células de melanoma tratadas com GGHS era decorrente da morte celular, foi realizada uma marcação com Anexina V e Iodeto de Propídeo (PI) e posterior avaliação em citometria de fluxo. A análise do resultado, mostrado na Figura 10, aponta que não ocorreu perda de viabilidade celular, nem houve morte nas células de melanoma expostas a GGH e GGHS (100 µg/mL) durante 72h.

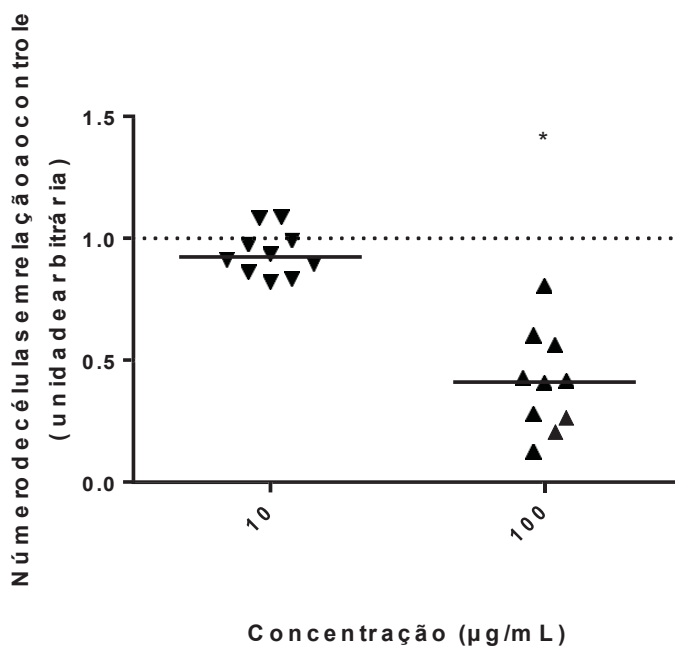
FIGURA 8 – Viabilidade e proliferação celular de células de melanoma e fibroblasto quando expostas aos polissacarídeos GGH ou GGHS



Após 24 horas em cultura, células de melanoma B16-F10 (A/B) ou de fibroblastos BALB/3T3 (C/D) foram expostas ou não (controle) a diferentes concentrações (0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 ou 100 µg/mL) de GGH (A/C) ou GGHS (B/D) por 72 horas e, então, foram analisadas quanto a capacidade de retenção do corante vermelho neutro (VN) e a densidade celular pela coloração dos núcleos celulares pelo corante cristal violeta (CV). Foram realizados quatro experimentos independentes em quadruplicata técnicas. Os dados estão apresentados como média \pm SD. A comparação entre os grupos foi realizada com os dados normalizados pelo controle (linha pontilhada) com o uso do teste T paramétrico não pareado com a correção de Welch's (* $p < 0,05$).

Zhou e colaboradores (2018) isolaram uma galactomanana das sementes de *Sesbania cannabina*, com estrutura similar à da goma guar. Após um processo de hidrólise parcial desta, com enzima mananase, foram obtidos polissacarídeos com massas molares menores, sendo um deles, denominado GalM65, com massa molar $4,890 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$, similar em estrutura e em tamanho à fração GGH, e o derivado de $14,7 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ (GalM40). Tanto o polissacarídeo original, como os produzidos por hidrólise enzimática, mostraram-se citotóxicos de maneira concentração-dependente às células tumorais A549 (células de câncer pulmonar humano), MCF-7 (câncer de mama humano), HepG2 (hepatocarcinoma humano) e HeLa (câncer de colo de útero humano). A fração GalM65, a 100 µg/mL, reduziu em 40 a 60% a viabilidade das células tumorais testadas. Os autores verificaram também que as galactomananas, em concentrações de 100 a 400 µg/mL, induziam a morte celular pela ativação da expressão de caspase-12.

FIGURA 9 – Proliferação celular de células de melanoma tratadas com GGHS

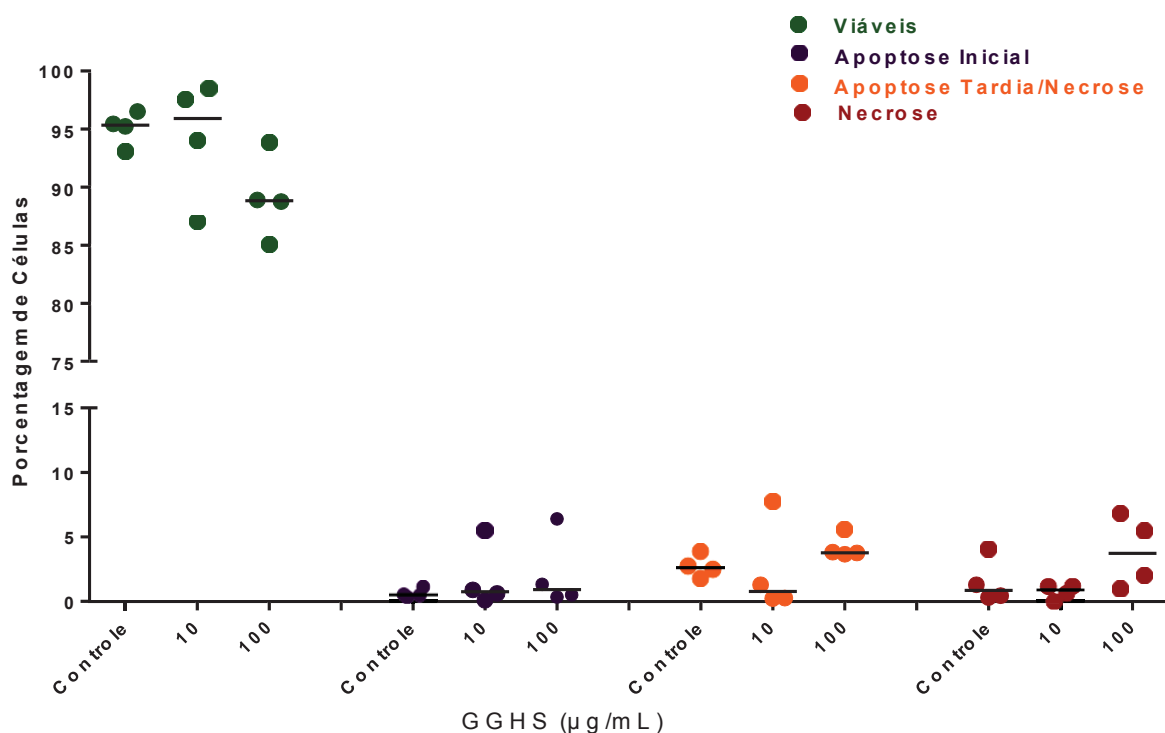


Após 24 horas em cultura, células de melanoma foram expostas ou não (controle) a diferentes concentrações (10 e 100 µg/mL) de GGHS por 72 horas, e então, as células foram desaderidas da placa e contadas em câmara de Neubauer. Cada ponto significa um experimento independente e a barra a mediana de cada grupo. A comparação entre os grupos foi realizada com os dados brutos, com o uso do teste T de Mann-Whitney (* $p < 0,0001$). Os dados foram normalizados pelo controle (linha pontilhada) para a apresentação.

Joseph e colaboradores (2013) isolaram e caracterizaram uma galactomanana (PSP001, $110 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) da casca da romã (*Punica granatum*) e no ensaio de MTT esse composto demonstrou uma inibição da proliferação da linhagem de melanoma A375, com um IC₅₀, dose em que o composto atingiu 50% da inibição do crescimento, de aproximadamente 85 µg/mL num período de 72 horas de tratamento. Através de marcação fluorescente com laranja de acridina e brometo de etídio, foi observado que esta galactomanana induzia a apoptose em células de melanoma em uma concentração de 10 µg/mL, quando estas eram tratadas durante 72 horas. Em ensaios *in vivo*, o polissacarídeo PSP001 não demonstrou toxicidade aguda em concentrações de até 2 g/kg. Células de adenocarcinoma de Ehrlich foram implantadas nos camundongos Balb/c no dia 1 e o polissacarídeo PSP001 (100 mg/kg), a Doxorubicin (Dox) – controle positivo – e a combinação dos tratamentos foram administrados via intraperitoneal diariamente dos dias 2 ao 15. O grupo tratado com PSP001 demonstrou uma maior redução do volume tumoral do que o grupo tratado com Dox. A combinação dos tratamentos PSP001+Dox foi capaz de causar uma redução ainda maior do volume tumoral. Apesar de ensaios de viabilidade celular

em uma linhagem não tumoral *in vitro* não terem sido realizados, a galactomanana PSP001 não demonstrou toxicidade ou indicativos de efeitos colaterais nos animais durante os testes *in vivo*.

FIGURA 10 – Determinação da viabilidade e morte celular de células de melanoma tratadas com GGHS



Após 24 horas em cultura, células de melanoma (B16-F10) foram expostas ou não (controle) a diferentes concentrações (10 ou 100 µg/mL) de GGHS por 72 horas. Após o período de tratamento as células foram marcadas com Anexina V e PI e os dados foram adquiridos por citometria de fluxo.

Cada ponto significa um experimento independente e a barra a mediana de cada grupo. A comparação entre os grupos foi realizada com o uso do teste T não paramétrico não pareado de Mann-Whitney.

A literatura mostra alguns polissacarídeos que possuem citotoxicidade seletiva para células tumorais (KHAN et al., 2019) e os dados obtidos com GGHS demonstram uma diminuição da proliferação das células de melanoma, porém não alteram esse parâmetro na linhagem de fibroblastos, ao passo que com o GGH ambas as linhagens celulares não tiveram sua proliferação alterada.

Nosso Grupo de Pesquisa tem buscado investigar a atividade antitumoral de polissacarídeos não citotóxicos (BELLAN et al., 2020; BISCAIA et al., 2017) e, portanto, com os dados adquiridos com ensaios de viabilidade e proliferação, a concentração de 100 µg/mL foi selecionada para dar continuidade às investigações apresentadas a seguir.

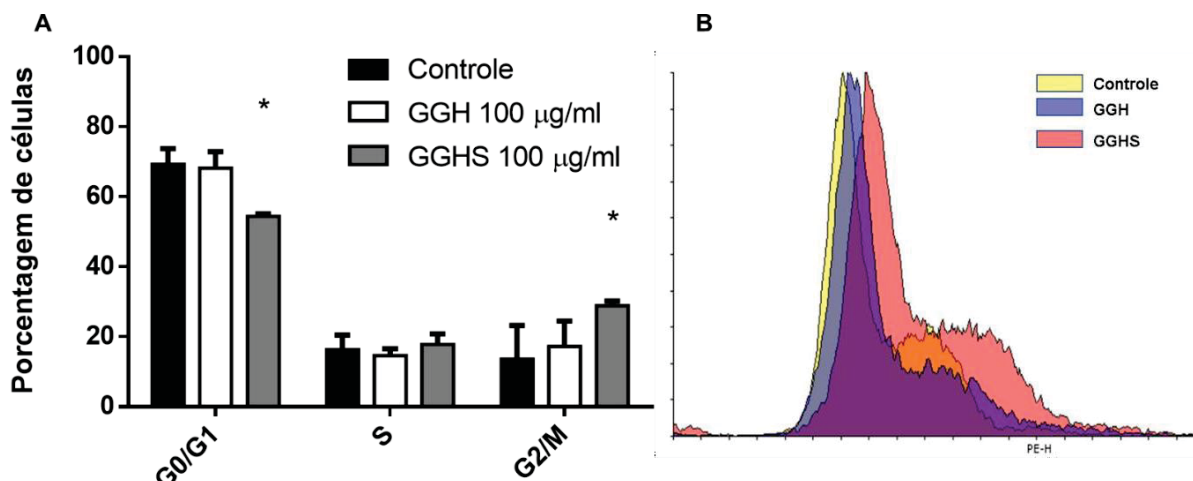
3.1 Avaliação do papel dos polissacarídeos na progressão do ciclo celular

A capacidade de sustentar a sinalização para a proliferação celular foi a primeira das seis características das células cancerosas a ser descrita (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Uma grande quantidade de quimioterápicos e adjuvantes no tratamento do câncer atuam de alguma forma impedindo a progressão do ciclo celular. O Paclitaxel e a Vincristina atuam estabilizando e inibindo a polimerização da tubulina, respectivamente, e dessa forma impedindo com que ocorra a mitose (BHARADWAJ; YU, 2004; SILVERMAN; DEITCHER, 2013; WILLIAMS; STOEGER, 2012). Alguns polissacarídeos também já demonstraram ser capazes de impedir a progressão do ciclo celular (KHAN et al., 2019).

Uma vez que o polissacarídeo GGHS diminuiu a proliferação celular, sem provocar a morte das células, foi investigado se este composto poderia estar alterando o controle do ciclo celular. Os dados obtidos com o ensaio de PI/RNase mostram que as células tratadas com GGHS apresentavam quantidade de DNA semelhante àquelas do grupo controle, corroborando com os dados anteriormente apresentados. Porém, células tratadas com o polissacarídeo GGHS mostraram alterações no ciclo celular quando comparadas às células do grupo controle. Houve uma diminuição de 15% das células que se encontravam em G0/G1 e consequente aumento de 15% de células na fase G2/M quando comparado com o grupo controle, sugerindo que a redução na proliferação das células tratadas com GGHS está associada à alteração no controle do ciclo celular (Figura 11).

Hung e colaboradores (2012) demonstraram que uma fração polissacarídica rica em arabinogalactanas extraída dos frutos de *Zizyphus jujuba* tiveram um efeito semelhante ao encontrado para o polissacarídeo GGHS neste trabalho. A fração estimulava a parada do ciclo celular em células de melanoma diminuindo a quantidade de células em G0/G1 e aumentando a quantidade de células na fase G2/M em comparação ao controle. Tal polissacarídeo provocou também um aumento da morte celular por apoptose nas células de melanoma. Chen e colaboradores (2018) isolaram uma arabinogalactana da raiz de *Morus alba* (RMP1), uma planta utilizada na medicina tradicional chinesa, e o composto provocou o aumento da apoptose e parada do ciclo celular na fase S em células de adenocarcinoma gástrico (SGC-7901). Assim como encontrado no presente trabalho, a arabinogalactana não induziu citotoxicidade em células não tumorais das linhagens de macrófagos murino (RAW264.7) e em células renais embrionárias (HEK-293).

FIGURA 11 – Análise das fase do ciclo celular de células B16-F10 tratadas com GGHS



Após 24 horas em cultura, células de melanoma (B16-F10) foram expostas ou não (controle) a GGH ou GGHS na concentração de 100µg/mL por 72 horas. Após esse período as células foram marcadas com PI/RNase e os dados foram adquiridos por citometria de fluxo. A – Porcentagem das populações nas fases G0/G1, S ou G2/M; B – Histograma representativo da quantidade de DNA detectado por citometria de fluxo presente nas células de melanoma (B16-F10). Foram realizados 4 experimentos independentes, onde estão representadas as medianas de cada grupo e o intervalo interquartil. A comparação entre os grupos foi realizada com o uso do teste T não paramétrico não pareado de Mann-Whitney (* $p < 0,05$).

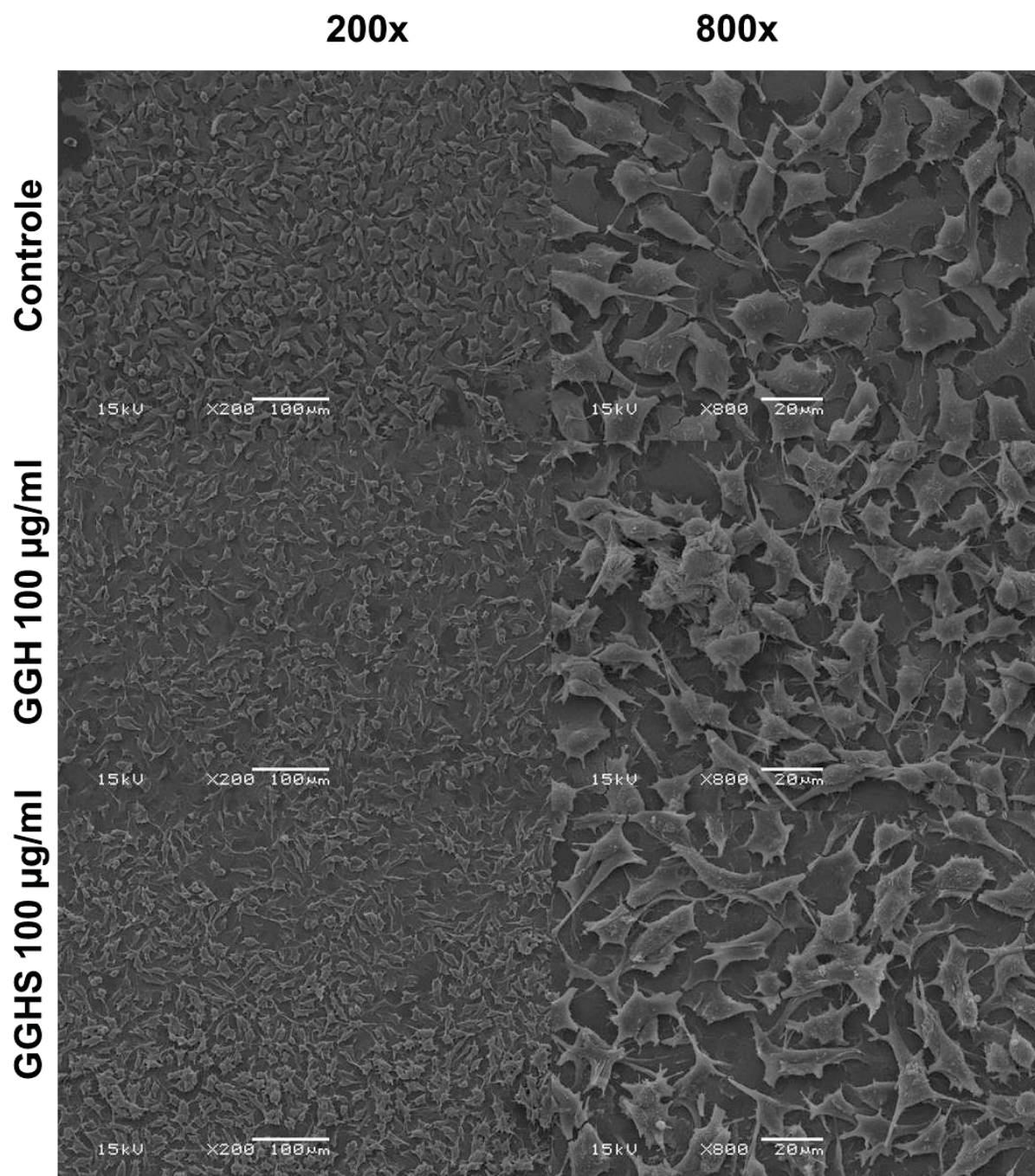
Analisando a literatura encontrada, na maioria dos casos, a alteração do ciclo celular está associada ao aumento da morte celular por apoptose (KHAN et al., 2019; ZONG; CAO; WANG, 2012), o que não acontece com o polissacarídeo GGHS, como analisado no ensaio de Anexina V/PI (Figura 10).

3.2 Efeito dos polissacarídeos na morfologia celular

Alterações fisiológicas celulares podem ser refletidas em alterações na morfologia celular, dessa forma, a alteração nesse parâmetro pode ser um indicativo de citotoxicidade (JUNEAU; GARNIER; DUCHESNE, 2017).

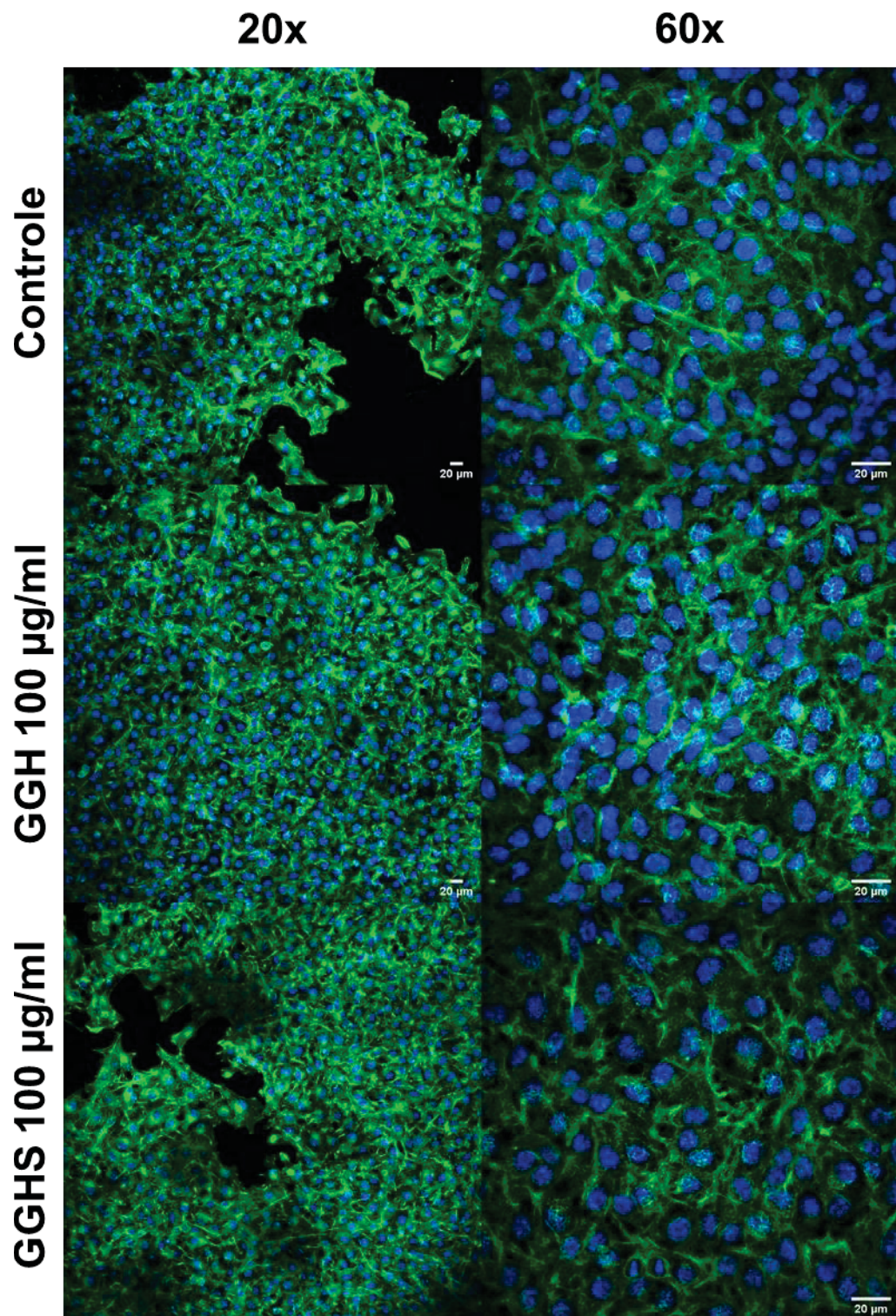
A análise ultraestrutural da morfologia das células de melanoma (B16-F10) tratadas com os polissacarídeos (100 µg/mL) e cultivadas sobre as lamínulas de vidro não apresentaram alterações morfológicas significativas em relação às células não tratadas (grupo controle). Tal resultado foi observado tanto por microscopia eletrônica de varredura (Figura 12), quanto por microscopia de varredura a laser confocal (Figura 13).

FIGURA 12 – Análise morfológica das células de melanoma expostas ou não a GGH ou GGHS por microscopia eletrônica de varredura



Células de melanoma (B16-F10) foram cultivadas em lâminulas circulares de vidro, em placas de 24 poços, e após 24 horas de cultivo as células foram expostas ou não (controle) a GGH ou GGHS na concentração de 100µg/mL por 72 horas. Após o tratamento as células foram fixadas com glutaraldeído 2,5% e pós-fixadas com tetróxido de Ósmio 1%, sendo que as duas soluções foram preparadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2. Após esse passo, as células foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e duas vezes com 100% v/v), submetidas ao ponto crítico com CO₂ e metalizadas com ouro. As imagens foram capturadas no microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM 6360 – LV SCANNING ELECTRON MICROSCOPE), nos aumentos de 200 e 800 vezes.

FIGURA 13 – Análise morfológica das células de melanoma (B16-F10) expostas ou não a GGH ou GGHS por microscopia confocal

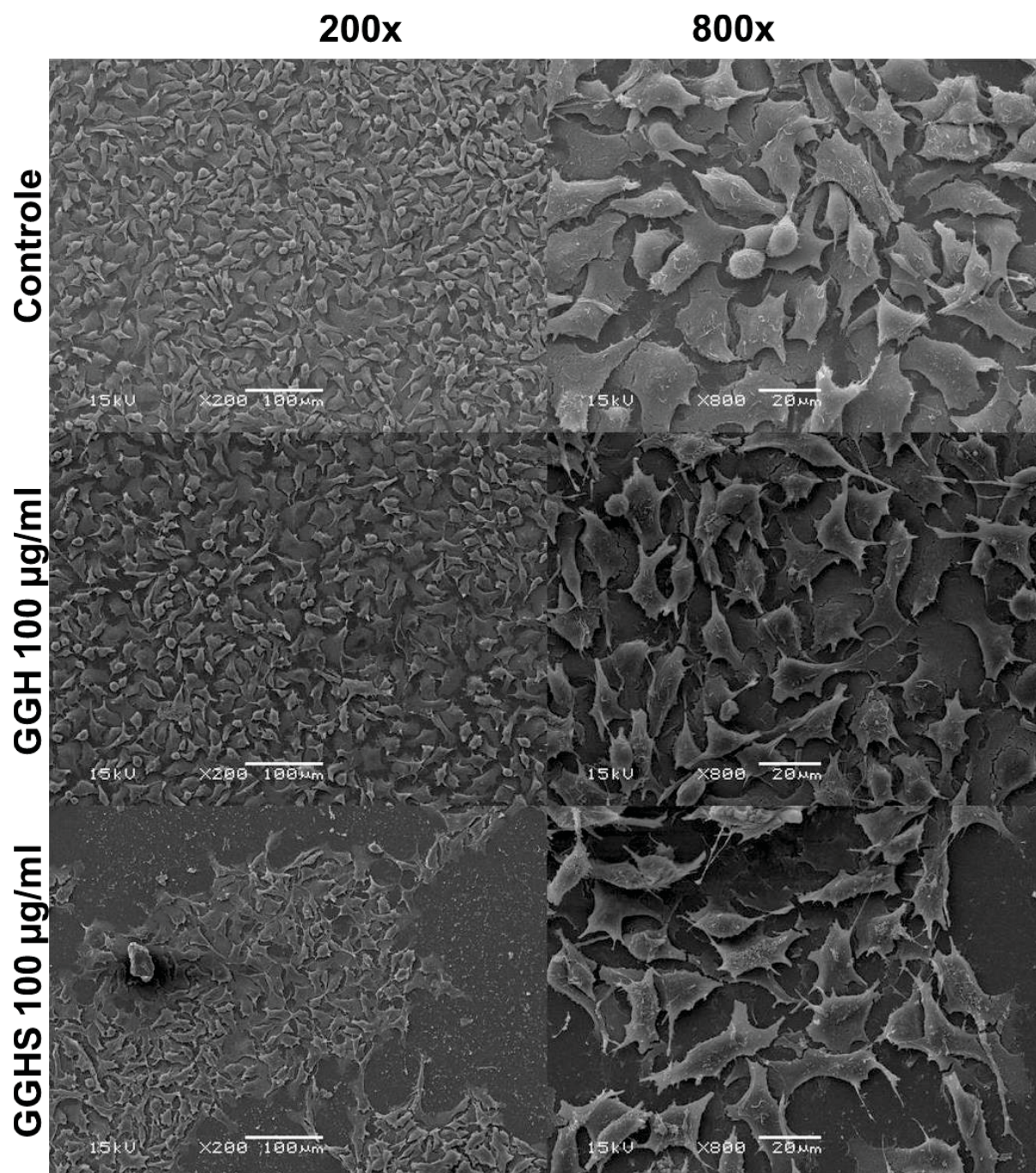


Células de melanoma (B16-F10) foram cultivadas em lamínulas circulares de vidro, em placas de 24 poços, e após 24 horas de cultivo as células foram expostas ou não (controle) a GGH ou GGHS na concentração de 100µg/mL por 72 horas. Após o tratamento as células foram fixadas com PFA 2%, marcadas com DAPI (azul), que evidencia os núcleos celulares, e ActinGreen (verde), que evidencia os filamentos de actina, nas objetivas de 20 (A, C e E) e 60x (B, D e F) no microscópio de varreduras a laser confocal A1R MP+ (Nikon).

Ao analisar as células de melanoma (B16-F10) cultivadas sobre o revestimento de Matrigel® (20 µg/mL) e na presença de GGHS (100 µg/mL), pode-se observar que há o aumento da formação de projeções de membrana (Figura 14 G e H). Esse aumento de projeções de membrana pode ser uma das explicações para o aumento da adesão em Matrigel® das células de melanoma (B16-F10) tratadas com GGHS (Figura 16), que será discutido no subitem 3.3. Já em relação as células expostas ao GGH (100 µg/mL), há o indicativo de uma menor interação célula-matriz, com uma diminuição do espreadimento celular em relação às células controle.

Vayssade e colaboradores (2009) avaliaram o efeito de uma ramnogalacturonana tipo I (RG-I) obtida do quiabo, em células B16-F10, plaqueadas sobre o revestimento de polyHEMA (Polihidroxietilmetacrilato). As células tratadas com RG-I apresentaram uma menor expressão de moléculas de adesão, como a N-caderina e a integrina- $\alpha 5$, e uma maior expressão de galectina-3, em relação ao grupo controle. Levando em consideração a morfologia celular, houve uma diminuição da adesão das células no substrato polyHEMA, o que está de acordo com a diminuição das moléculas de adesão. A alteração de morfologia descrita por Vayassade e colaboradores (2009) também poderia ser explicada pela entrada das células no processo de apoptose. Tais efeitos de alteração de morfologia, similarmente ao que foi visto para GGH, não foram descritas para células cultivadas sobre lamínulas de vidro sem revestimento.

FIGURA 14 – Análise morfológica das células B16-F10 expostas a GGH ou GGHS sobre revestimento de Matrigel em microscopia eletrônica de varredura



Células de melanoma (B16-F10) foram cultivadas em lamínulas circulares de vidro revestidas com 200 µL de Matrigel® (20 µg/mL), em placas de 24 poços, e após 24 horas de cultivo as células foram expostas ou não (controle) a GGH ou GGHS na concentração de 100 µg/mL por 72 horas. Após o tratamento, as células foram fixadas com glutaraldeído 2% e pós-fixadas com tetróxido de Ósmio 1%, sendo que as duas soluções foram preparadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2. A seguir, as células foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e duas vezes com 100% v/v), submetidas ao ponto crítico com CO₂ e metalizadas com ouro. As imagens foram capturadas no microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM 6360 – LV SCANNING ELECTRON MICROSCOPE), nos aumentos de 200 (A, C e E); 800 (B, D e F); 6.000 (G) e 13.000 (H) vezes. **A/B** – Controle; **C/D** células tratadas com GGH 100 µg/mL; **E/F/G/H** células tratadas com GGHS 100 µg/mL.

3.3 Influência dos polissacarídeos GGH e GGHS sobre parâmetros de malignidade

O melanoma corresponde a apenas 4% de todos os cânceres de pele, porém é o responsável por cerca de 80% das mortes derivadas desse tipo de câncer (MILLER; MIHM, 2006). Isso decorre do fato de que o melanoma tem uma alta capacidade metastática (BRAEUER et al., 2014) e, dentre as principais características desse processo de metástase estão a motilidade, redução de adesão celular e a capacidade de invadir e colonizar tecidos adjacentes, alcançando a corrente sanguínea e linfática (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011; WELCH; HURST, 2019).

Para que a célula tumoral dê origem a focos metastáticos ela precisa degradar a matriz extracelular, migrar e ser capaz de formar novas colônias em outros tecidos (PAUL; MISTRIOTIS; KONSTANTOPOULOS, 2017; WELCH; HURST, 2019). O ensaio *in vitro* que mimetiza esse processo é o de invasão celular, que foi o passo seguinte do trabalho.

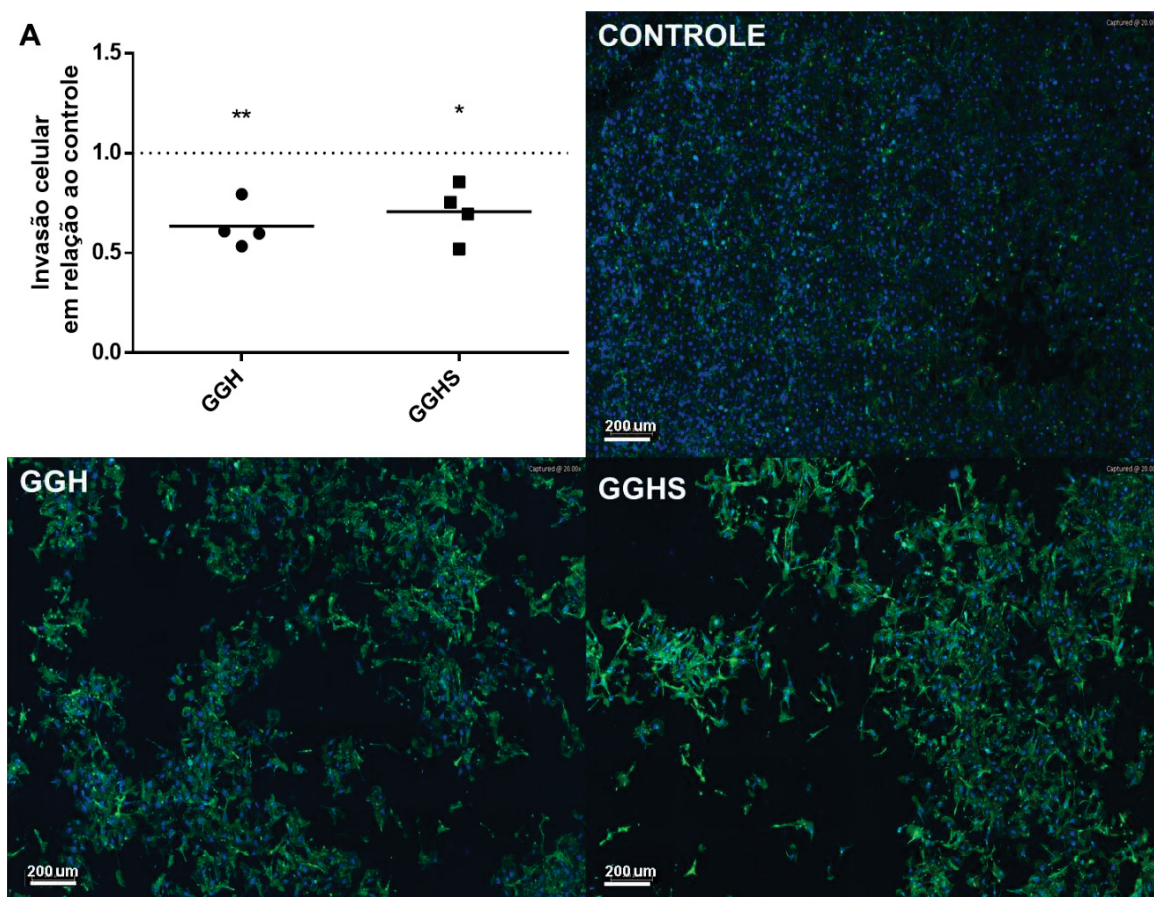
Os dados obtidos com o ensaio de invasão estão ilustrados na Figura 15, onde pode-se observar o gráfico representativo dos resultados e as imagens obtidas após visualização dos insertos em microscópio de fluorescência. Analisando os dados é possível observar que GGH e GGHS reduziram em 36% e 29%, respectivamente, a capacidade invasiva das células de melanoma (B16-F10) quando comparado com o grupo controle. Esse dado é extremamente relevante, pois mesmo sem alterar a viabilidade celular, os tratamentos foram capazes de diminuir a capacidade invasiva das células de melanoma, característica esta importante para a malignidade e progressão tumoral (MILLER; MIHM, 2006; MÜLLER et al., 2010)

Varghese e colaboradores (2017) descreveram o efeito *in vitro* da galactomanana extraída da romã (PSP001), *Punica granatum*, *in vitro* na inibição da capacidade metastática de células de melanoma murino (B16-F10) e humano (A375). No ensaio de invasão o polissacarídeo (100 µg/mL) foi capaz de reduzir de 80 a 90% a capacidade invasiva das células de melanoma. No entanto, esse efeito foi observado durante um tratamento simultâneo, ou seja, as células só entraram em contato com o composto durante o período de invasão. No experimento realizado no presente trabalho, as células foram pré tratadas, e após o período de tratamento (72 horas) foram desaderidas e replaqueadas sobre Matrigel e no momento da invasão elas não estavam na presença dos compostos, podendo indicar um efeito de reprogramação das células cancerosas. O polissacarídeo PSP001 também causou uma redução na expressão de MMP-2 e MMP-9, e causou um aumento da expressão de TIMP-1 e

TIMP-2 em células de melanoma A375. Essas enzimas estão envolvidas diretamente no processo de remodelamento da matriz extracelular (PARKS, 2006), e, portanto, possuem extrema importância no processo invasivo e na progressão do melanoma (MORO; MAUCH; ZIGRINO, 2014).

Um dos marcadores da progressão do melanoma é a transição epitélio-mesenquimal, extremamente importante para a progressão tumoral. Neste processo, ocorre diminuição da expressão de E-caderina e aumento da N-caderina (LI et al., 2015). Células de melanoma humano que tiveram a expressão de N-caderina bloqueada, tiveram a capacidade invasiva diminuída (CIOŁCZYK-WIERZBICKA; LAIDLER, 2018). Quando há o aumento da expressão de N-caderina, as células perdem o ancoramento do tumor primário, há o aumento da agregação homotípica, favorecendo a migração das células tumorais (CIOŁCZYK-WIERZBICKA; LAIDLER, 2018; HAASS et al., 2005). Essa perda da adesão entre as células e o ponto de ancoragem, pode ocasionar um aumento da migração celular e o início de um processo metastático (ABDULJAUWAD; AHMED, 2019). Geralmente, as células dos tumores primários já possuem uma menor capacidade adesiva do que as células dos tecidos normais (OPPENHEIMER, 2006).

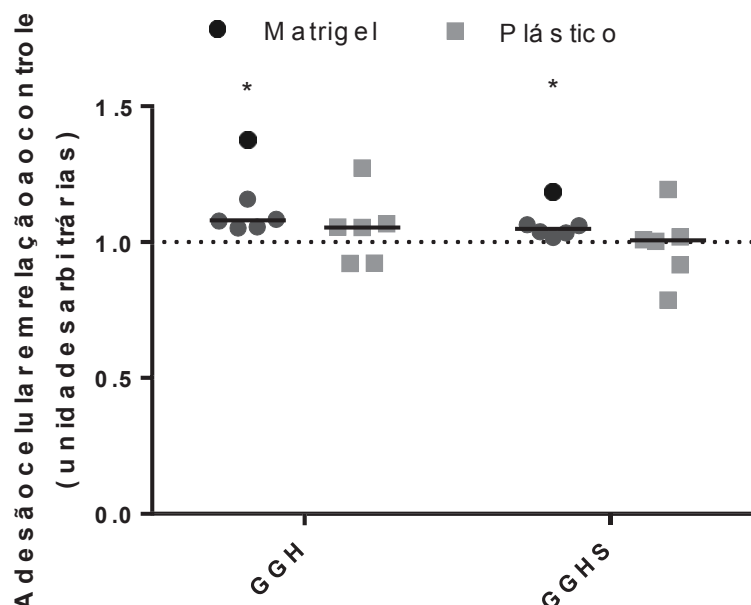
FIGURA 15 – Avaliação do potencial invasivo das células de melanoma tratadas com GGH ou GGHS



Após 24 horas em cultura, células B16-F10 foram expostas ou não (controle) a GGH ou GGHS na concentração de 100μg/mL por 72 horas, após esse período as células foram plaqueadas sobre insertos com poros de 8 μm previamente cobertos com Matrigel, no fundo de cada poço foi adicionado meio de cultura DMEM contendo 10 % de SFB. Após o período de invasão (72h) as células foram fixadas com PFA 2% e tiveram seus núcleos marcados com DAPI (azul) e o citoesqueleto marcado com faloidina conjugada com alexa flúor 488 (verde). As imagens foram obtidas Lâminas Histológicas. A – Cada ponto representa um experimento independente e a barra representa a média de cada grupo, a linha pontilhada representa o controle. A comparação entre os grupos foi realizada com o uso do teste T paramétrico não pareado com a correção de Welch's (significância de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Os polissacarídeos GGH e GGHS foram capazes de aumentar a adesão das células de melanoma (B16-F10) sobre Matrigel® (matriz celular composta principalmente por laminina, colágeno IV, proteoglicano de heparan sulfato e entactina/nidogênio) em relação às células controle (Figura 16). O resultado é extremamente importante pois corrobora com o resultado observado nos testes de capacidade invasiva das células tratadas com os polissacarídeos, sendo que nesse ensaio o Matrigel® também é utilizado para fazer o revestimento dos insertos, sugerindo que o aumento da adesão das células tratadas com os polissacarídeos pode estar associado com a diminuição da capacidade invasiva destas.

FIGURA 16 – Adesão de células de melanoma (B16-F10) tratadas com GGH ou GGHS



Após 24 horas em cultura, células B16-F10 foram expostas ou não (controle) a GGH ou GGHS na concentração de 100µg/mL por 72 horas. Após o tratamento, as células foram avaliadas com relação ao seu potencial de aderir ao plástico (poço da placa de cultura sem revestimento) ou Matrigel®. Cada ponto representa um experimento independente e a barra representa a média de cada grupo, a linha pontilhada representa o controle. A comparação entre os grupos foi realizada com o uso do teste T paramétrico não pareado com a correção de Welch's (significância de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Outro parâmetro celular relacionado ao fenótipo metastático do melanoma analisado foi a capacidade clonogênica. Tal propriedade foi alterada nas células de melanoma tratadas com GGH e GGHS. Quando as células foram expostas aos polissacarídeos durante o ensaio não houve diferenças no número de colônias formadas em relação às células controle (Figura 17 A). Entretanto, o tamanho das colônias formadas a partir de células tratadas com GGH e GGHS (100 µg/mL) foi reduzido em 12% e 48%, respectivamente (FIGURA 17B). Tal resultado concorda com os dados de viabilidade, proliferação celular e análise do ciclo celular, que mostrou que GGHS não foi citotóxico, porém diminuiu a taxa de proliferação celular por frear o ciclo celular, aumentando o número de células que permanece na fase G2/M em relação às células não tratadas.

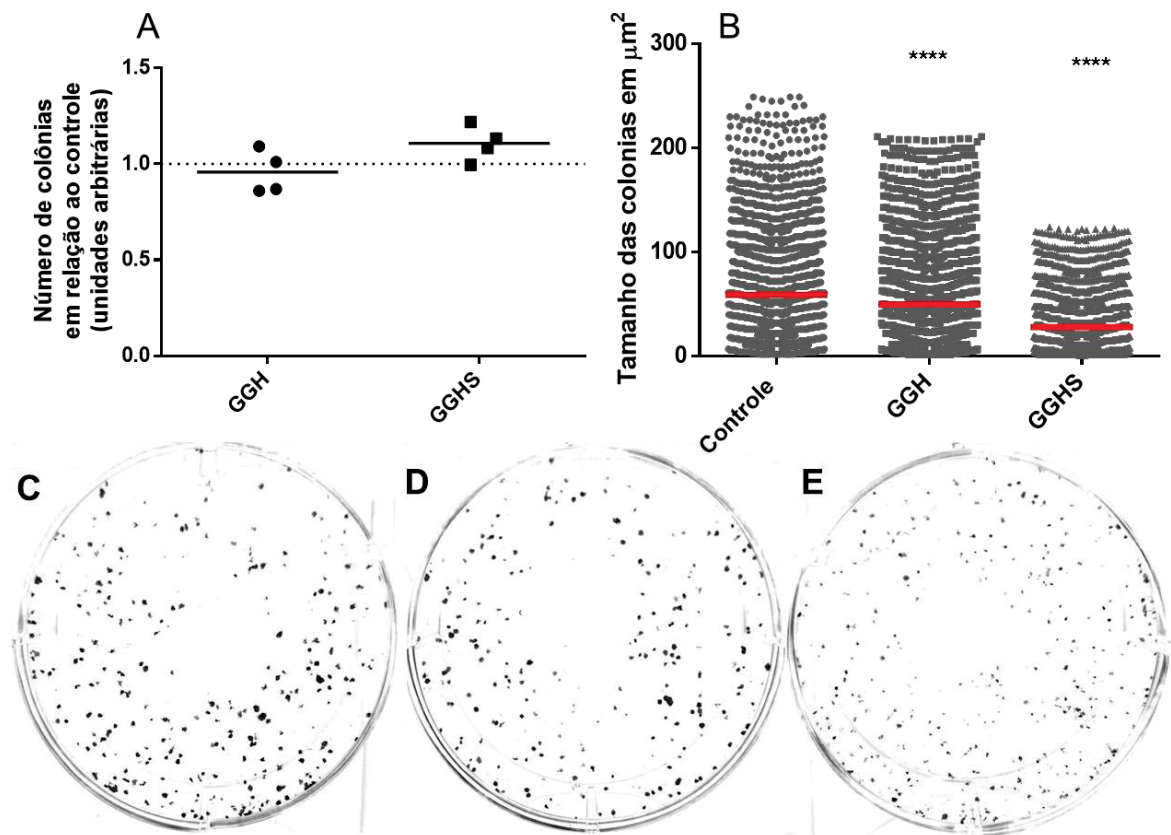
O tratamento com GGHS (100 µg/ml) ocasionou uma maior homogeneidade entre o tamanho das colônias, esse dado pode demonstrar uma menor variabilidade do fenótipo das células que foram expostas ao composto. Greaves e Maley (2012) em sua revisão sobre a pressão seletiva durante o tratamento antitumoral, demonstraram que a associação de tratamentos é importante para evitar uma recidiva do câncer. Thakur e Stuart (2013) demonstraram que as células de melanoma que eram

resistentes ao tratamento de Vemurafenib foram suscetíveis ao tratamento quando eram expostas a doses intermitentes do medicamento. Dessa forma uma associação do GGHS com um quimioterápico pode ocasionar uma redução das células tumorais resistentes ao tratamento.

Com relação à capacidade migratória, células de melanoma expostas aos polissacarídeos GGH e GGHS previamente ao ensaio de migração não tiveram sua capacidade migratória alterada (Figura 18). Porém, células expostas a GGH simultaneamente ao ensaio de migração diminuíram sua capacidade migratória em 35%. O polissacarídeo GGHS não alterou a capacidade migratória das células de melanoma (Figura 18).

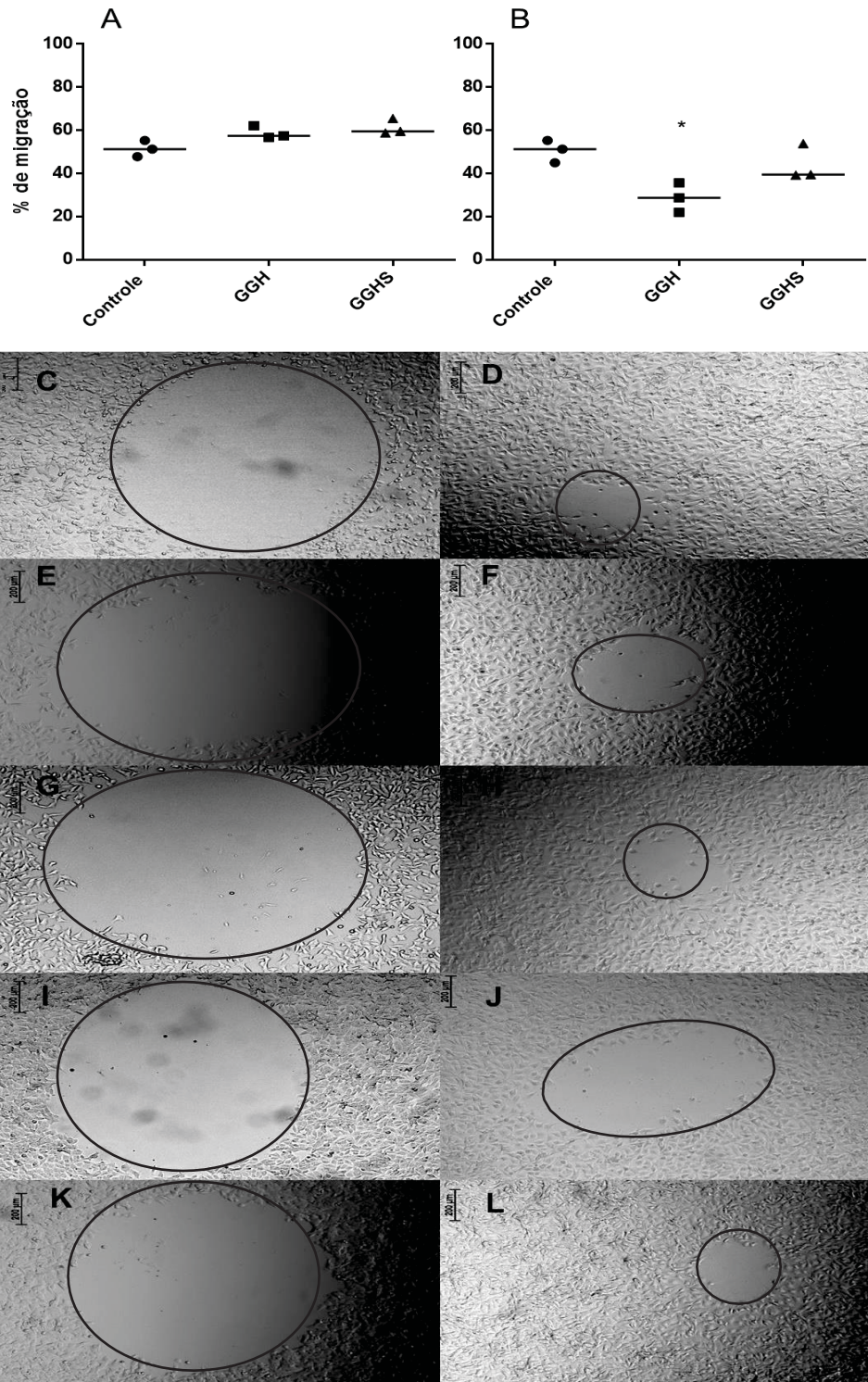
Varghese e colaboradores (2017) demonstraram que a galactomanana extraída das sementes de romã (PSP001; 100 µg/mL), com estrutura similar à do polissacarídeo GGH, reduziu a capacidade migratória das células de melanoma murino B16-F10 e A375 em 90% e 64%, respectivamente.

FIGURA 17 – Capacidade de formação de colônias das células de melanoma (B16-F10) na presença dos polissacarídeos GGH ou GGHS



Células B16-F10 foram plaqueadas em placas de 6 poços em baixa confluência (400 células/poço). As células então foram mantidas em incubadora por 96h na presença dos polissacarídeos ou não (grupo controle) e então, foram fixadas. Os núcleos celulares foram corados com cristal violeta. A – Número de colônias em relação ao controle, cada ponto representa um experimento independente, a linha pontilhada representa o controle e a barra representa a média de cada grupo. A comparação entre os grupos foi realizada com o uso do teste T paramétrico não pareado com a correção de Welch's. B - Tamanho das colônias dos grupos tratados ou não (grupo controle). Cada ponto representa uma colônia, no gráfico estão representadas todas as colônias de todos os experimentos. A barra representa a mediana de cada grupo. Imagens representativas dos grupos C – Controle; D – células tratadas com GGH (100 $\mu\text{g/mL}$); E - células tratadas com GGHS (100 $\mu\text{g/mL}$). A comparação entre os grupos foi realizada com o uso do teste T não paramétrico não pareado de Mann-Whitney (significância de **** $p < 0,0001$).

FIGURA 18 – Avaliação da capacidade migratória das células B16-F10 pré-tratadas com GGH ou GGHS ou na presença de GGH ou GGHS



A - Após o tratamento prévio das células B16-F10 com GGH ou GGHS na concentração de 100µg/mL por 72 horas, as células foram replaqueadas, expostas a mitomicina e uma parte das células foi retirada com vácuo. As culturas foram fotografadas no tempo zero e após 21 horas e a área aberta foi medida. B - Células B16-F10 plaqueadas, expostas a mitomicina e uma parte das células foi retirada com vácuo. As células foram expostas ou não (controle) a GGH ou GGHS na concentração de 100µg/mL, durante o período de migração. C/D - Controle; E/F - Pré-tratamento com GGH; G/H - Pré-tratamento com GGHS; I/J - Tratamento simultâneo com GGH; K/L - Tratamento simultâneo com GGHS. Cada ponto corresponde a $(100 - (\frac{\text{área Final}}{\text{área inicial}}) \times 100)$ em porcentagem, as barras representam a mediana de cada grupo. Dados analisados por teste de Mann-Whitney (* $p < 0,05$).

3.4 Avaliação do potencial de ligação dos polissacarídeos em galectinas

O Davanat[®], um polissacarídeo derivado da hidrólise ácida parcial da goma guar (MILLER et al., 2009; ZOMER; KLYOSOV; PLATT, 2012) foi descrito como ligante de galectina-1. Trabalhos na literatura apontam que tal ligação se dá em um sítio de ligação diferente do domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD), pois ocorre a ligação tanto do Davanat[®] quanto da lactose na galectina-1 ao mesmo tempo (MILLER; KLYOSOV; MAYO, 2009).

Os polissacarídeos utilizados nesse trabalho, sendo o GGH similar ao Davanat[®], como esperado, também demonstraram a capacidade de se ligar a galectina-1 (Figura 20). O GGH, na concentração de 100 µg/mL, apresentou um padrão de ligação específica para a galectina-1 a partir de 2.000 s de exposição. Previamente a esse tempo houve um aumento da massa do sensor, porém esse aumento inicial provavelmente deve-se a uma deposição inespecífica do polissacarídeo. Após os 2.000s há a estabilização do sinal referente ao aumento de massa, sugerindo uma ligação mais estável e específica (Figura 20A).

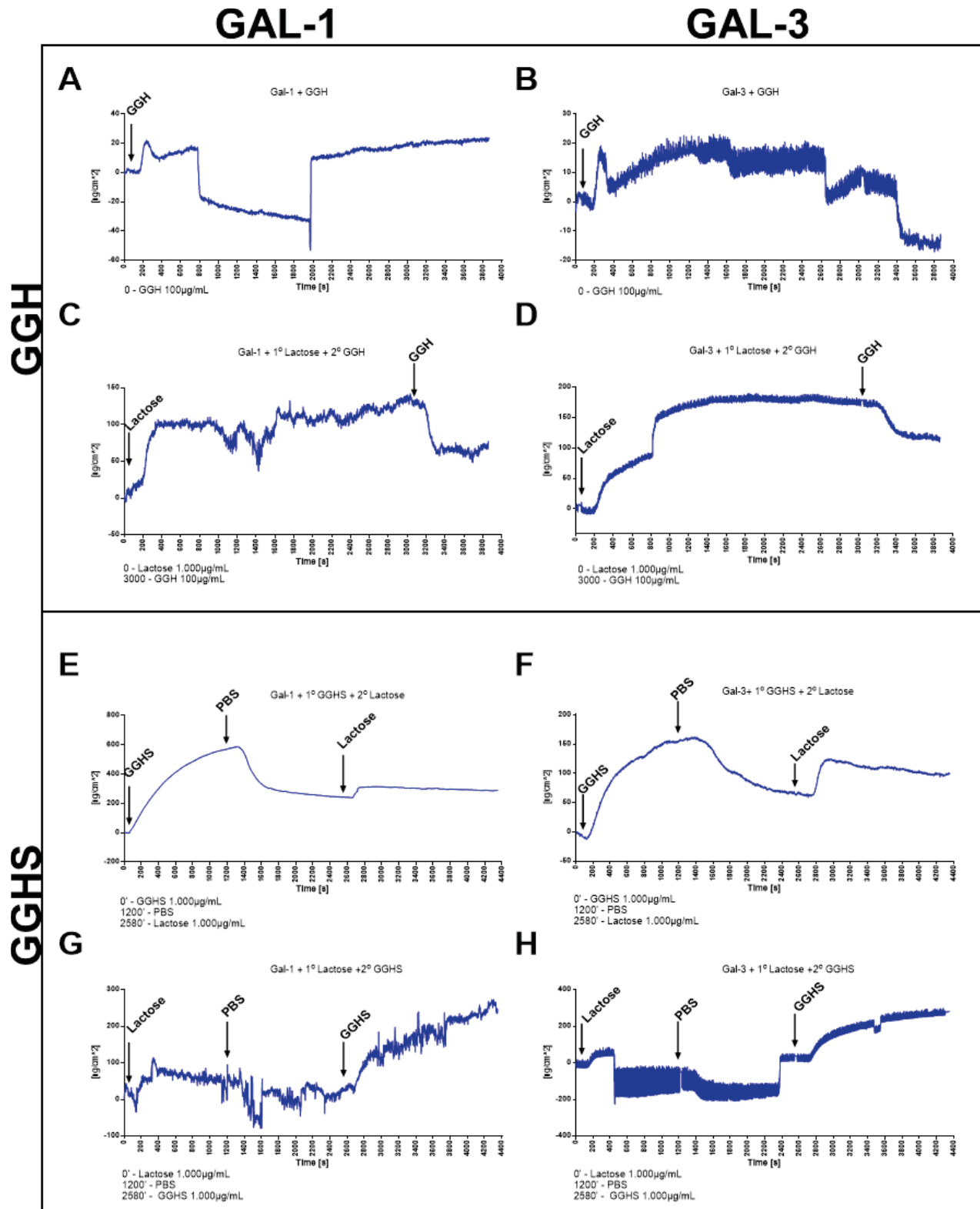
Os ensaios com o GGHS foram realizados em uma concentração maior, de 1.000 µg/mL, pois analisando a estrutura das moléculas e as premissas químicas necessárias para ligação em galectina no domínio CRD esperava-se que a sulfatação em muitas das hidroxilas livres do polímero diminuísse sua capacidade de ligação às galectinas (NESMELOVA et al., 2010; STEGMAYR et al., 2016). Nessa concentração, o GGHS, após 1400s já apresentou uma estabilização da ligação, sugerindo ligação deste com as galectinas 1 e 3.

Com o intuito de investigar se os polissacarídeos estavam se ligando ao mesmo domínio de ligação do controle positivo, lactose, que se liga ao domínio CRD das galectinas (ZHUANG; LEFFLER; PRESTEGARD, 2006; NESMELOVA et al., 2010), foi injetado lactose em fluxo contínuo aos sensores e a massa adsorvida foi medida. Tal estratégia foi feita tanto injetando lactose antes, como depois de ter sido injetado o polissacarídeo GGHS.

Na Figura 20 E é possível observar que, depois da estabilização da ligação entre gal-1 e GGHS, se ofertada a lactose, ocorre um aumento da massa sobre o sensor, demonstrando que apesar da ligação da GGHS ocorre a ligação da lactose, resultado este que sugere que o polissacarídeo se liga a gal-1 em um local diferente do domínio CRD.

Em relação a galectina-3 não é possível afirmar se a GGH se liga de maneira específica, pois não há uma estabilização do sinal do sensor (Figura 20B). Já o polissacarídeo GGHS demonstrou um comportamento parecido ao que apresentou para a galectina-1, onde há um aumento da massa adsorvida no sensor, e ao injetar a lactose, com a galectina-3 já exposta a GGHS há um aumento da massa, sugerindo a ligação dos dois compostos ao mesmo tempo na gal-3 (Figura 20F), o que também ocorre ao expor primeiro a lactose, e depois a GGHS há o aumento da massa adsorvida no sensor. Quando a lactose foi ofertada inicialmente às galectinas, e posteriormente foi injetado o polissacarídeo GGH, houve uma diminuição de massa, o que pode sugerir que GGH desloca as unidades de lactose do domínio CRD das galectinas (Figura 20 C e D).

FIGURA 19 – Interação entre as galectinas 1 e 3 com os polissacarídeos GGH e GGHS

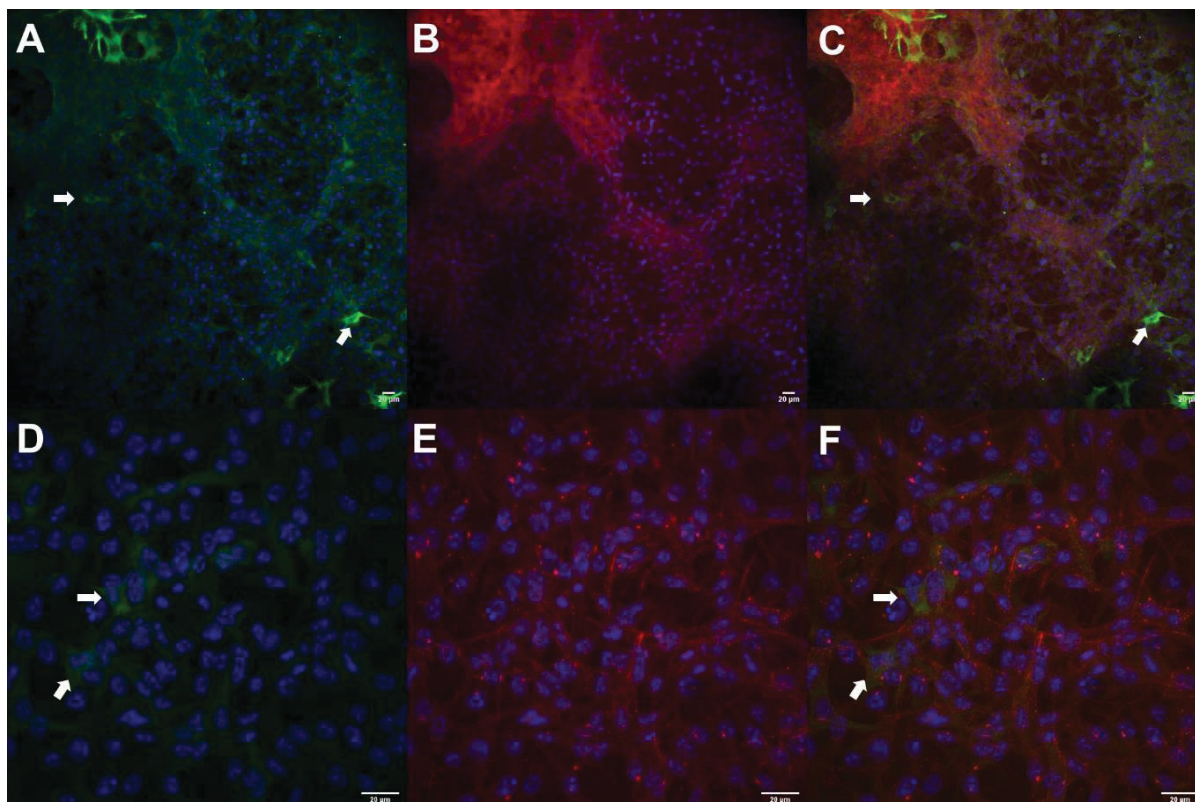


Gráficos representam interação dos polissacarídeos GGH (100 µg/mL) e GGHS (1000 µg/mL) e do oligossacarídeo lactose (1000 µg/mL) (controle positivo de ligação ao domínio CRD) com galectina-1 ou com galectina-3. As setas indicam o momento em que foram adicionados PBS, lactose, ou os polissacarídeos.

3.5 Presença de galectina-3 nas células de melanoma

Com o objetivo de avaliar se as células B16-F10 expressavam galectina-3, bem como se sua localização era intra- ou extracelular, foram feitas análises em microscopia de fluorescência confocal. Como pode ser observado na Figura 21, as células B16-F10 expressam galectina-3 intracelularmente.

FIGURA 20 – Expressão de galectina-3 nas células de melanoma



Células de melanoma (B16-F10) foram cultivadas em lamínulas circulares de vidro, em placas de 24 poços, e após 96 horas em cultura, as células foram fixadas com PFA 2%, sendo posteriormente submetidas à marcação de galectina-3, em verde, bem como submetida à marcação do citoesqueleto em vermelho e os núcleos das células foram marcados com DAPI (azul), como descrito em Material e Métodos. Objetiva de 20x; A – Imagem mostrando os núcleos e a marcação para galectina-3. B – Imagem mostrando os núcleos celulares e os filamentos de actina X. C – Sobreposição das imagens A e B. Objetiva de 60x; D – Imagem mostrando os núcleos e a marcação para galectina-3. E – Imagem mostrando os núcleos celulares e os filamentos de actina. F – Sobreposição das imagens D e E; as imagens acima foram obtidas no microscópio de varredura a laser confocal, modelo A1R MP+ (Nikon). As setas indicam alguns pontos de marcação para galectina-3

Comodo e colaboradores (2013) também já haviam mostrado que células de melanoma B16-F10 expressavam galectina-3 bem como o papel desta lectina na progressão tumoral. Em estudos *in vivo* utilizando camundongos *knock-out* (KO) para galectina-3 observaram que, após injeção de células B16-F10, tanto tumores sólidos como as metástases observadas eram significativamente reduzidas.

Wang e colaboradores (2012) avaliaram a diferença de expressão da galectina-3 entre as células B16-F10 e B16-F1, sendo que as células B16-F10 possuem uma maior capacidade metastática do que a linhagem B16-F1 (NAKAMURA et al., 2002), e concluíram que as células B16-F10 expressam uma quantidade maior dessa galectina, quando comparada com a linhagem menos metastática. Os pesquisadores também realizaram um *knock-down* (KD) de galectina-3 nas células B16-F10, pela técnica de RNA de interferência (siRNA), e foi observado que as células KD tiveram a sua capacidade migratória diminuída ao se comparar com as células selvagens (NAKAMURA et al., 2002).

Tendo em vista que células de melanoma expressam galectina-3 e que foi observada a ligação dos polissacarídeos tanto em galectina-3 como em galectina-1, estudos futuros poderão apontar esta ou outras galectinas como potenciais alvos moleculares dos polissacarídeos GGH e GGHS.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após realização e interpretação dos resultados deste trabalho, abrem-se novas perspectivas de futuras investigações no sentido de explicar as alterações de comportamento celular observadas. Neste sentido, seria interessante investigar a expressão das MMPs 2 e 9 nas células tratadas com GGH e GGHS, e realizar uma zimografia para avaliar a atividade dessas enzimas, já que elas estão diretamente envolvidas no processo de invasão celular.

Como foi visto que os polissacarídeos provocaram diminuição no tamanho de colônias e redução na migração celular, é interessante investigar se a diminuição da invasão celular é potencializada se tal experimento for feito na presença dos polissacarídeos.

Os resultados preliminares de ligação à galectina e de detecção e localização de galectina-3 nas células B16F10 controle e tratadas com os polissacarídeos serão repetidos para validar as sugestões levantadas na descrição dos resultados.

Dentre as perspectivas baseadas nos resultados obtidos neste trabalho, ressalta-se a importância em investigar a interação entre os polissacarídeos e as galectinas em um ambiente *in vitro*, bem como buscar outros possíveis alvos moleculares nos quais os compostos estejam atuando. Devido a presença de sulfato e a carga negativa, o GGHS tem a capacidade, por exemplo, de interagir com diversas proteínas e glicoconjugados presentes na matriz extracelular, e já tem a sua capacidade anticoagulante descrita.

Estudos *in vivo* com animais *knockout* para as galectinas 1 e para a 3 tornam-se interessantes também para avaliar as diferentes respostas tumorais em animais tratados com estes polímeros.

5 CONCLUSÕES

Os polissacarídeos GGH e GGHS foram obtidos de acordo com Barddal e colaboradores (2020), e após caracterização química, foi comprovada a reprodutibilidade dos processos de síntese química. Foram obtidas estruturas muito semelhantes com aquelas produzidas por Barddal e colaboradores (2020), de onde foi retirada a metodologia de síntese dos polímeros aqui testados. GGH e GGHS não alteraram a viabilidade celular, de ambas as linhagens testadas, porém o composto sulfatado, GGHS, demonstrou um efeito antiproliferativo em células B16-F10, alterando a dinâmica do ciclo celular e dessa forma diminuindo a quantidade de células presentes em cultura após 96h de cultivo. Quando as células de melanoma foram cultivadas sobre o revestimento de Matrigel®, o polissacarídeo GGHS provocou um aumento nas projeções de membrana. Tais modificações morfológicas podem estar associadas ao aumento de adesão sobre o Matrigel® observado nas células B16F10 tratadas com GGHS.

Ambos os polissacarídeos foram capazes de alterar dinâmicas metastáticas. Tanto GGH como GGHS reduziram a invasão celular e o tamanho de colônias formadas no ensaio clonogênico. Entretanto, apenas o polissacarídeo GGH foi capaz de diminuir a capacidade migratória das células de melanoma.

Em ensaios preliminares para verificar o potencial dos polissacarídeos em se ligar à galectinas 1 e 3, foi observado que ambos os polissacarídeos eram capazes de se ligar às galectinas, porém com intensidades distintas e provavelmente em diferentes domínios de ligação. A presença de galectina 3 nas células de melanoma foi testada e identificada por microscopia confocal. Desta forma, sugere-se que as galectinas possam estar envolvidas nas respostas antimetastáticas observadas.

Diante dos resultados encontrados, conclui-se que GGH e GGHS têm potencial para ser utilizados como agentes antitumorais, motivando estudos futuros *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ABDULJAUWAD, S. N.; AHMED, H. UR R. Enhancing cancer cell adhesion with clay nanoparticles for countering metastasis. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Key Statistics for Melanoma Skin Cancer**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/about/key-statistics.html>>. Acesso em: 13 abr. 2020.
- ARRANGOIZ, R. Melanoma Review: Epidemiology, Risk Factors, Diagnosis and Staging. **Journal of Cancer Treatment and Research**, v. 4, n. 1, p. 1, 21 abr. 2016.
- ASTORGUES-XERRI, L. et al. Unraveling galectin-1 as a novel therapeutic target for cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 40, n. 2, p. 307–319, mar. 2014.
- BAGHERI, S. et al. Using gold nanoparticles in diagnosis and treatment of melanoma cancer. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 46, n. sup1, p. 462–471, 2018.
- BANH, A. et al. Tumor Galectin-1 Mediates Tumor Growth and Metastasis through Regulation of T-Cell Apoptosis. **Cancer Research**, v. 71, n. 13, p. 4423–4431, 1 jul. 2011.
- BAO, X. et al. Antitumor and immunomodulatory activities of a polysaccharide from *Artemisia argyi*. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 1, p. 1236–1243, out. 2013.
- BARAK, S.; MUDGIL, D. Locust bean gum: Processing, properties and food applications-A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 66, p. 74–80, 2014.
- BARBIERI, A. et al. Anticancer and anti-inflammatory properties of ganoderma lucidum extract effects on melanoma and triple-negative breast cancer treatment. **Nutrients**, v. 9, n. 3, 2017.
- BARONDES, S. H. et al. Galectins: A family of animal β -galactoside-binding lectins. **Cell**, v. 76, n. 4, p. 597–598, 25 fev. 1994.
- BATUS, M. et al. Optimal management of metastatic melanoma: Current strategies and future directions. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 14, n. 3, p. 179–194, jun. 2013.
- BELLAN, D. L. et al. Non-Cytotoxic Sulfated Heterorhamnan from *Gayralia brasiliensis* Green Seaweed Reduces Driver Features of Melanoma Metastatic Progression. **Marine Biotechnology**, 2020.
- BHARADWAJ, R.; YU, H. The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. **Oncogene**, v. 23, n. 11 REV. ISS. 1, p. 2016–2027, 2004.
- BISCAIA, S. M. P. et al. Safe therapeutics of murine melanoma model using a novel antineoplastic, the partially methylated mannogalactan from *Pleurotus eryngii*. **Carbohydrate Polymers**, v. 178, n. May, p. 95–104, 2017.
- BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A.; YORK, N. A SIMPLE QUANTITATIVE P R O C E D U R E USING MONOLAYER CULTURES FOR INTRODUCTION Flow hood. v. 9, n. 75101, p. 7–8, 1985.
- BORSIG, L. Antimetastatic activities of heparins and modified heparins. Experimental evidence. **Thrombosis Research**, v. 125, p. S66–S71, abr. 2010.
- BRAEUER, R. R. et al. The sweet and bitter sides of galectins in melanoma progression. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 25, n. 5, p. 592–601, 2012.
- BRAEUER, R. R. et al. Why is melanoma so metastatic? **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 27, n. 1, p. 19–36, jan. 2014.
- BROWN, E. R. et al. Association of galectin-3 expression with melanoma progression and prognosis. **European Journal of Cancer**, v. 48, n. 6, p. 865–874, 2012.

- CALIFICE, S. et al. Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: Tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3. **Oncogene**, v. 23, n. 45, p. 7527–7536, 2004.
- CHANG, A. E.; KARNELL, L. H.; MENCK, H. R. The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: a summary of 84,836 cases from the past decade. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. **Cancer**, v. 83, n. 8, p. 1664–78, 1998.
- CHEN, F. et al. Isolation, Characterization and Antitumor Effect on DU145 Cells of a Main Polysaccharide in Pollen of Chinese Wolfberry. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2430, 21 set. 2018a.
- CHEN, Y. et al. Structural characterization and antitumor activity of a polysaccharide from ramulus mori. **Carbohydrate Polymers**, v. 190, n. February, p. 232–239, 2018b.
- CHOROMANSKA, A. et al. Anticancer properties of low molecular weight oat beta-glucan – An in vitro study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 23–28, set. 2015.
- CIOŁCZYK-WIERZBICKA, D.; LAIDLER, P. The inhibition of invasion of human melanoma cells through N-cadherin knock-down. **Medical Oncology**, v. 35, n. 4, p. 1–9, 2018.
- CLAUSSE, N. et al. Galectin-1 expression in prostate tumor-associated capillary endothelial cells is increased by prostate carcinoma cells and modulates heterotypic cell-cell adhesion. **Angiogenesis**, v. 3, n. 4, p. 317–325, 1999.
- CLEMENTE, N. et al. Solid lipid nanoparticles carrying temozolomide for melanoma treatment. Preliminary in vitro and in vivo studies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, 2018.
- CLINICALTRIALS.GOV IDENTIFIER: NCT00388700. **A New Agent GM-CT-01 in Combination With 5-FU, Avastin and Leucovorin in Subjects With Colorectal A New**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00388700?term=davanat&draw=1&rank=1>>. Acesso em: 10 mar. 2020.
- COMODO, A. N. et al. Galectin-3 expression favors metastasis in murine melanoma. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 04, n. 10, p. 55–62, 2013.
- COTIGNOLA, J. et al. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) polymorphisms in patients with cutaneous malignant melanoma. **BMC Medical Genetics**, v. 8, p. 1–10, 2007.
- COUSIN, J. M.; CLONINGER, M. J. **The role of galectin-1 in cancer progression, and synthetic multivalent systems for the study of Galectin-1** **International Journal of Molecular Sciences**, 2016.
- DAAS, P. J. H. et al. Toward the recognition of structure-function relationships in galactomannans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 15, p. 4282–4289, 2002.
- DANTAS-SANTOS, N. et al. Antiproliferative activity of fucan nanogel. **Marine Drugs**, v. 10, n. 9, p. 2002–2022, 2012.
- DAVIS, E. J. et al. **Melanoma: What do all the mutations mean?** **Cancer** John Wiley and Sons Inc., , 1 set. 2018.
- DE IESO, M. L.; PEI, J. V. An accurate and cost-effective alternative method for measuring cell migration with the circular wound closure assay. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 5, p. 1–9, 2018.
- DE OLIVEIRA BARDDAL, H. P. et al. Anticoagulant and antithrombotic effects of chemically sulfated guar gum. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 145, p. 604–610, fev. 2020.

- DEMOTTE, N. et al. A short treatment with galactomannan GM-CT-01 corrects the functions of freshly isolated human tumor-infiltrating lymphocytes. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 7, p. 1823–1833, 1 abr. 2014.
- DEY, P. M. Biochemistry of plant galactomannans. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 35, n. C, p. 341–376, 1978.
- DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **The Biochemical journal**, v. 84, n. 1, p. 106–110, 1 jul. 1962.
- ELOLA, M. T. et al. Galectins: Multitask signaling molecules linking fibroblast, endothelial and immune cell programs in the tumor microenvironment. **Cellular Immunology**, v. 333, n. January, p. 34–45, mar. 2018.
- FALANGA, A.; MARCHETTI, M.; VIGNOLI, A. Coagulation and cancer: Biological and clinical aspects. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 11, n. 2, p. 223–233, fev. 2013.
- FANG, Y. et al. Polysaccharides extracted from rhizoma pleionis have antitumor properties in vitro and in an H22 mouse hepatoma ascites model in vivo. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, p. 1–19, 2018.
- FLUHR, H.; SEITZ, T.; ZYGMUNT, M. Heparins modulate the IFN- γ -induced production of chemokines in human breast cancer cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 137, n. 1, p. 109–118, 2013.
- FOUAD, Y. A.; AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. **American Journal of Cancer Research**, v. 7, n. 5, p. 1016–1036, 2017.
- FRANKEN, N. A. P. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 21 dez. 2006.
- GAMAL-ELDEEN, A. M.; AMER, H.; HELMY, W. A. Cancer chemopreventive and anti-inflammatory activities of chemically modified guar gum. **Chemico-Biological Interactions**, v. 161, n. 3, p. 229–240, 2006.
- GILLIES, R. J.; DIDIER, N.; DENTON, M. Determination of cell number in monolayer cultures. **Analytical Biochemistry**, v. 159, n. 1, p. 109–113, 1986.
- GONÇALVES, J. P. **A detailed optimization for in vitro cell invasion assay: execution and analysis**, [s.d.].
- GONZALEZ, D. et al. BRAF mutation testing algorithm for vemurafenib treatment in melanoma: Recommendations from an expert panel. **British Journal of Dermatology**, v. 168, n. 4, p. 700–707, abr. 2013.
- GORANTLA, V. C.; KIRKWOOD, J. M. State of Melanoma. An Historic Overview of a Field in Transition. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 28, n. 3, p. 415–435, jun. 2014.
- GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 851–857, 22 fev. 2007.
- GREAVES, M.; MALEY, C. C. Clonal evolution in cancer. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 306–313, 18 jan. 2012.
- GUPTA, S. et al. Food Hydrocolloids Comparative analysis of dietary fiber activities of enzymatic and gamma depolymerized guar gum. **Food hydrocolloids**, v. 48, p. 149–154, 2015.
- HAASS, N. K. et al. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. **Pigment Cell Research**, v. 18, n. 3, p. 150–159, jun. 2005.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 7 jan. 2000.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.

- HIRA, I. et al. Pectin-guar gum-zinc oxide nanocomposite enhances human lymphocytes cytotoxicity towards lung and breast carcinomas. **Materials Science and Engineering C**, v. 90, p. 494–503, 2018.
- HUNG, C. F. et al. Antiproliferation of melanoma cells by polysaccharide isolated from *Zizyphus jujuba*. **Nutrition**, v. 28, n. 1, p. 98–105, 2012.
- HUSEMANN, E. **Methods in Carbohydrate Chemistry**. Herausgeg. v.R. L. Whistler, R. J. Smith, J. N. BeMiller und M. L. Wolfrom. Vol. IV: Starch. Academic Press, New York-London 1964. 1. Aufl., XVI, 335 S., zahlr. Abb. u. Tab., geb. \$ 13.50. [s.l: s.n.]. v. 77
- ICCVAM. ICCVAM-Recommended Test Method Protocol BALB/c 3T3 NRU Cytotoxicity Test Method. **ICCVAM Test Method Evaluation Report: In Vitro Cytotoxicity Test Methods for Estimating Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests**, n. November, 2006.
- JAVADINIA, S. A. et al. Anti-tumoral effects of low molecular weight heparins: A focus on the treatment of esophageal cancer. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 10, p. 6523–6529, 2018.
- JAYARAM, S.; KAPOOR, S.; DHARMESH, S. M. Pectic polysaccharide from corn (*Zea mays* L.) effectively inhibited multi-step mediated cancer cell growth and metastasis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 235, p. 63–75, jun. 2015.
- JIA, S. et al. Recent advances in *Momordica charantia*: Functional components and biological activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, 2017.
- JIANG, G. et al. Dacarbazine combined targeted therapy versus dacarbazine alone in patients with malignant melanoma: A meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–13, 2014.
- JOHANNES, L.; JACOB, R.; LEFFLER, H. Galectins at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 131, n. 9, p. jcs208884, 2018.
- JOHNSON, D. B.; SOSMAN, J. A. Therapeutic advances and treatment options in metastatic melanoma. **JAMA Oncology**, v. 1, n. 3, p. 380–386, 2015.
- JOSEPH, M. M. et al. A galactomannan polysaccharide from *Punica granatum* imparts in vitro and in vivo anticancer activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 2, p. 1466–1475, nov. 2013.
- JUNEAU, P. M.; GARNIER, A.; DUCHESNE, C. Monitoring of adherent live cells morphology using the undecimated wavelet transform multivariate image analysis (UWT-MIA). **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 1, p. 141–153, 13 jan. 2017.
- KALIKS, R. A. et al. How is advanced melanoma treated in the Public Health System in Brazil: a call for change. **Brazilian Journal of Oncology**, p. 1–7, 2019.
- KHALILI, A. A.; AHMAD, M. R. A Review of cell adhesion studies for biomedical and biological applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 8, p. 18149–18184, 2015.
- KHAMMANIT, R. et al. Effect of serum starvation and chemical inhibitors on cell cycle synchronization of canine dermal fibroblasts. **Theriogenology**, v. 70, n. 1, p. 27–34, 2008.
- KHAN, T. et al. Polysaccharides as potential anticancer agents—A review of their progress. **Carbohydrate Polymers**, v. 210, n. January, p. 412–428, abr. 2019.
- KLYOSOV, A. A. Galectin-Targeted Drug Design. **Glycobiology and Drug Design**, 2012.
- KLYOSOV, A.; ZOMER, E.; PLATT, D. DAVANAT® (GM-CT-01) and colon cancer: Preclinical and clinical (Phase I and II) studies. **ACS Symposium Series**, v. 1102, p. 89–130, 2012a.

- KLYOSOV, A.; ZOMER, E.; PLATT, D. DAVANAT® (GM-CT-01) and colon cancer: Preclinical and clinical (Phase I and II) studies. In: **ACS Symposium Series**. [s.l.: s.n.]. v. 1102p. 89–130.
- KWAN, Y. P. et al. Evaluation of the cytotoxicity, cell-cycle arrest, and apoptotic induction by *Euphorbia hirta* in MCF-7 breast cancer cells. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 7, p. 1223–1236, 2016.
- LI, F. Z. et al. Phenotype switching in melanoma: Implications for progression and therapy. **Frontiers in Oncology**, v. 5, n. FEB, p. 1–7, 2015.
- LIMA, M.; RUDD, T.; YATES, E. New Applications of Heparin and Other Glycosaminoglycans. **Molecules**, v. 22, n. 5, p. 749, 6 maio 2017.
- LIU, F. T.; RABINOVICH, G. A. Galectins as modulators of tumour progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 1, p. 29–41, 1 jan. 2005.
- LUO, C. C. et al. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor downregulates expression of activator protein-1 transcription factor after intestinal ischemia-reperfusion injury. **Neonatology**, v. 99, n. 4, p. 241–246, 2011.
- LUO, J. et al. Guar gum different from: *Ganoderma lucidum* polysaccharide in alleviating colorectal cancer based on omics analysis. **Food and Function**, v. 11, n. 1, p. 572–584, 2020.
- MARGOLIS, N.; MARKOVITS, E.; MARKEL, G. Reprogramming lymphocytes for the treatment of melanoma: From biology to therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 141, p. 104–124, 2019.
- MAVERAKIS, E. et al. Metastatic melanoma – A review of current and future treatment options. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 95, n. 5, p. 516–524, 2015.
- MILHORINI, S. DA S. et al. Fucogalactan from the giant mushroom *Macrocybe titans* inhibits melanoma cells migration. **Carbohydrate Polymers**, v. 190, n. February, p. 50–56, 2018.
- MILLER, A. J.; MIHM, M. C. Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 1, p. 51–65, 6 jul. 2006.
- MILLER, M. C. et al. Using pulse field gradient NMR diffusion measurements to define molecular size distributions in glycan preparations. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 10, p. 1205–1212, 2009.
- MILLER, M. C.; KLYOSOV, A.; MAYO, K. H. The α -galactomannan Davanat binds galectin-1 at a site different from the conventional galectin carbohydrate binding domain. **Glycobiology**, v. 19, n. 9, p. 1034–1045, 1 set. 2009.
- MISHRA, H. et al. Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 144, n. 12, p. 2283–2302, 2018.
- MORO, N.; MAUCH, C.; ZIGRINO, P. Metalloproteinases in melanoma. **European Journal of Cell Biology**, v. 93, n. 1–2, p. 23–29, 2014.
- MÜLLER, M. et al. MMP19 is upregulated during melanoma progression and increases invasion of melanoma cells. **Modern Pathology**, v. 23, n. 4, p. 511–521, 2010.
- MULLOY, B. et al. Pharmacology of Heparin and Related Drugs. **Pharmacological Reviews**, v. 68, n. 1, p. 76–141, 15 dez. 2015.
- NAKAMURA, K. et al. Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. **Life Sciences**, v. 70, n. 7, p. 791–798, 2002.
- NANGIA-MAKKER, P. et al. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. **American Journal of Pathology**, v. 156, n. 3, p. 899–909, 2000.
- NESMELOVA, I. V. et al. Lactose Binding to Galectin-1 Modulates Structural Dynamics, Increases Conformational Entropy, and Occurs with Apparent Negative Cooperativity. **Journal of Molecular Biology**, v. 397, n. 5, p. 1209–1230, abr. 2010.

- OBA-SHINJO, S. M. et al. Melanocyte Transformation Associated with Substrate Adhesion Impediment. **Neoplasia**, v. 8, n. 3, p. 231–241, mar. 2006.
- OBSERVATORY, G. H. **WHO Cancer 部位別**. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 7 maio. 2018.
- OLIVEIRA, R. S. et al. Structure elucidation of a bioactive fucomannogalactan from the edible mushroom *Hypsizygus marmoreus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 225, n. August, p. 115203, 2019.
- OPPENHEIMER, S. B. Cellular basis of cancer metastasis: A review of fundamentals and new advances. **Acta Histochemica**, v. 108, n. 5, p. 327–334, 2006.
- ORGANIZATION, W. H. **WHO | Skin cancers**. Disponível em: <<https://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>>. Acesso em: 2 maio. 2018.
- PALUNCIC, J. et al. Roads to melanoma: Key pathways and emerging players in melanoma progression and oncogenic signaling. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 4, p. 770–784, abr. 2016.
- PARK, J. Y. et al. Polysaccharides from Korean Citrus hallabong peels inhibit angiogenesis and breast cancer cell migration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 522–529, 2016.
- PARKS, W. C. Matrix Metalloproteinases. **Encyclopedia of Respiratory Medicine, Four-Volume Set**, n. 37, p. 18–25, 2006.
- PASCHOA, A. F. Heparin: 100 years of pleiotropic effects. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 41, n. 4, p. 636–643, 16 maio 2016.
- PAUL, C. D.; MISTRIOTIS, P.; KONSTANTOPOULOS, K. Cancer cell motility: Lessons from migration in confined spaces. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 2, p. 131–140, 2017.
- PAZ, A. et al. Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. **Oncogene**, v. 20, n. 51, p. 7486–7493, 2001.
- PERILLO, N. L. et al. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. **Nature**, v. 378, n. 6558, p. 736–739, 14 dez. 1995.
- QUINTANILLA-DIECK, M. J.; BICHAKJIAN, C. K. Management of Early-Stage Melanoma. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 27, n. 1, p. 35–42, 2019.
- RASTRELLI, M. et al. Melanoma: Epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. **In Vivo**, v. 28, n. 6, p. 1005–1012, 2014.
- REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125–1131, 12 jun. 2008.
- ROSSI, G. R. **ATIVIDADES DA HEPARINA E DE HEPARINAS DESSULFATADAS EM MELANOMA MURINO E CÉLULAS NATURAL KILLER**. [s.l.] UFPR, 2020.
- RUBINSTEIN, N. et al. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection: A potential mechanism of tumor-immune privilege. **Cancer Cell**, v. 5, n. 3, p. 241–251, 2004.
- SANTI, F. C. **Avaliação Das Alterações Moleculares Causadas Por Polissacarídeos Sulfatados Em Modelo De Melanoma In Vitro**. [s.l.: s.n.].
- SCHINDELIN, J. et al. Fiji - an Open platform for biological image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, 2009.
- SHETH, R. A. et al. Thrombosis in cancer patients: Etiology, incidence, and management. **Cardiovascular Diagnosis and Therapy**, v. 7, n. S3, p. S178–S185, 2017.
- SILVERMAN, J. A.; DEITCHER, S. R. Marqibo® (vincristine sulfate liposome injection) improves the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vincristine. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 71, n. 3, p. 555–564, 5 mar. 2013.

- SIMON, A.; KOURIE, H. R.; KERGER, J. Is there still a role for cytotoxic chemotherapy after targeted therapy and immunotherapy in metastatic melanoma? A case report and literature review. **Chinese Journal of Cancer**, v. 36, n. 1, p. 1–5, 2017.
- SONG, L. et al. Galectin-3 in cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 431, p. 185–191, 2014.
- STEGMAYR, J. et al. Low or No Inhibitory Potency of the Canonical Galectin Carbohydrate-binding Site by Pectins and Galactomannans. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 25, p. 13318–13334, 17 jun. 2016.
- TAKENAKA, Y. et al. Malignant transformation of thyroid follicular cells by galectin-3. **Cancer Letters**, v. 195, n. 1, p. 111–119, 2003.
- THAKUR, M. D.; STUART, D. D. The Evolution of Melanoma Resistance Reveals Therapeutic Opportunities. **Cancer Research**, v. 73, n. 20, p. 6106–6110, 15 out. 2013.
- THIJSSSEN, V. L. et al. Tumor cells secrete galectin-1 to enhance endothelial cell activity. **Cancer Research**, v. 70, n. 15, p. 6216–6224, 2010.
- THOMBARE, N. et al. Guar gum as a promising starting material for diverse applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 88, p. 361–372, jul. 2016.
- U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Code of Federal Regulations Title 21 174-179**. Disponível em: <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=184.1339>>. Acesso em: 9 maio. 2018.
- VAN DEN BRÛLE, F. A. et al. Alteration of the cytoplasmic/nuclear expression pattern of galectin-3 correlates with prostate carcinoma progression. **International journal of cancer**, v. 89, n. 4, p. 361–7, 20 jul. 2000.
- VARGHESE, S. et al. The inhibitory effect of anti- tumor polysaccharide from Punica granatum on metastasis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 1000–1010, out. 2017.
- VARKI, A. Trousseau's syndrome: Multiple definitions and multiple mechanisms. **Blood**, v. 110, n. 6, p. 1723–1729, 2007.
- VAYSSADE, M. et al. Antiproliferative and proapoptotic actions of okra pectin on B16F10 melanoma cells. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 4, p. n/a-n/a, 2009.
- WANG, Y. G. et al. Galectin-3 increases the motility of mouse melanoma cells by regulating matrix metalloproteinase-1 expression. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 44, n. 6, p. 387–393, 2012.
- WELCH, D. R.; HURST, D. R. Defining the Hallmarks of Metastasis. **Cancer Research**, v. 79, n. 12, p. 3011–3027, 15 jun. 2019.
- WILLIAMS, G. H.; STOEBER, K. The cell cycle and cancer. **Journal of Pathology**, v. 226, n. 2, p. 352–364, 2012.
- XIA, J. et al. The role of adhesions between homologous cancer cells in tumor progression and targeted therapy. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 17, n. 6, p. 517–526, 3 jun. 2017.
- YANA, I. et al. Crosstalk between neovessels and mural cells directs the site-specific expression of MT1-MMP to endothelial tip cells. **Journal of Cell Science**, v. 120, n. 9, p. 1607–1614, 2007.
- YAO, Y. et al. HH1-1, a novel Galectin-3 inhibitor, exerts anti-pancreatic cancer activity by blocking Galectin-3/EGFR/AKT/FOXO3 signaling pathway. **Carbohydrate Polymers**, v. 204, n. July 2018, p. 111–123, 2019.
- YAZAWA, E. M. et al. Melanoma cell galectin-1 ligands functionally correlate with malignant potential. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 7, p. 1849–1862, jul. 2015.

- YOON, S.; CHU, D.; JUNEJA, L. R. Chemical and Physical Properties , Safety and Application of Partially Hydrolized Guar Gum as Dietary Fiber. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, n. January, p. 1–7, 2008.
- YOSHIOKA, T. et al. Homotypic Adhesion through Carcinoembryonic Antigen Plays a Role in Hepatic Metastasis Development. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 89, n. 2, p. 177–185, fev. 1998.
- ZHENG, Y.-F. et al. Extraction of polysaccharides and its antitumor activity on *Magnolia kwangsiensis* Figlar & Noot. **Carbohydrate Polymers**, v. 142, p. 98–104, maio 2016.
- ZHOU, M. et al. Isolation, characterization and in vitro anticancer activity of an aqueous galactomannan from the seed of *Sesbania cannabina*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 1241–1247, jul. 2018.
- ZHUANG, T.; LEFFLER, H.; PRESTEGARD, J. H. Enhancement of bound-state residual dipolar couplings: Conformational analysis of lactose bound to Galectin-3. **Protein Science**, v. 15, n. 7, p. 1780–1790, jul. 2006.
- ZOMER, E.; KLYOSOV, A. A.; PLATT, D. Development of a galactomannan polysaccharide as a vehicle to improve the efficacy of chemotherapeutics. In: **ACS Symposium Series**. [s.l: s.n.]. v. 1102p. 69–87.
- ZONG, A.; CAO, H.; WANG, F. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 4, p. 1395–1410, 2012.

ANEXO 1

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS GGH E GGHS

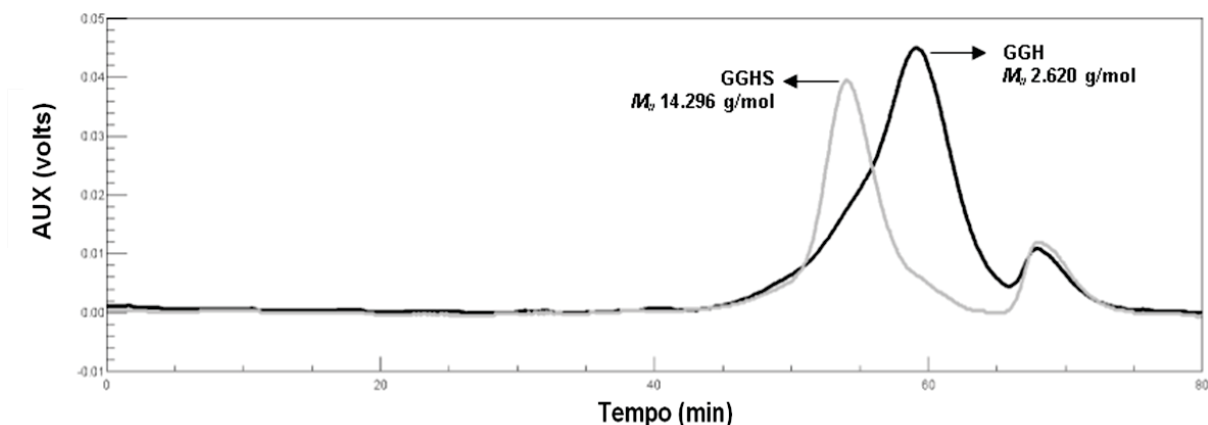
O procedimento de hidrólise ácida parcial na goma guar comercial gerou o polissacarídeo denominado GGH, com rendimento de 16,4% em relação ao peso inicial da goma guar. Uma parte do GGH foi submetida à sulfatação química, gerando o polissacarídeo sulfatado GGHS, com rendimento de 174% em relação à massa inicial de GGH. Tal aumento de massa do GGHS é justificado pela inserção de grupamentos sulfato na estrutura do polímero e também foi relatado, inclusive um aumento de massa muito semelhante, no artigo de Barddal e colaboradores (2020).

No intuito de quantificar os grupamentos sulfato inseridos na estrutura do polímero, bem como analisar o grau de substituição do GGHS, foi feita a dosagem turbidimétrica e os cálculos estão descritos na seção Material e Métodos. GGHS apresentou 17% de enxofre em sua estrutura, gerando um grau de substituição de 1,9. Tanto o rendimento como o grau de substituição encontrado para GGHS foram similares aos descritos por Bardall e colaboradores (2020), sugerindo a reprodutibilidade do método de síntese do composto GGHS.

Após análise de homogeneidade dos polissacarídeos por HPSEC-RI (Figura S1) foram observados dois picos cromatográficos na eluição de ambos, GGH e GGHS. Os picos com eluição em ~68 minutos referem-se ao solvente que provavelmente estava mais concentrado que o solvente de eluição na coluna cromatográfica. Os picos de maior intensidade, que eluíram em 59.3 minutos e em 54.1 minutos, referem-se aos polissacarídeos GGH e GGHS, respectivamente. Comparando estes tempos de eluição com uma curva de calibração feita com dextranas de massa molecular conhecidas foi possível estimar a massa molecular média relativa de GGH e GGHS em 2.620 e 14.296 g.mol⁻¹, respectivamente. O aumento da massa molecular relativa do GGHS em relação ao GGH se deve ao aumento de volume hidrodinâmico causado pela inserção de grupamentos sulfato na estrutura de GGHS, o que altera o tempo de eluição deste polímero nas colunas cromatográficas. Ressalta-se também que a própria adição de grupos sulfato no lugar de grupos hidroxila em praticamente todas

as unidades monossacarídicas da estrutura de GGHS já provoca por si só um aumento de massa.

FIGURA S1 – Análise de homogeneidade dos polissacarídeos GGH e GGHS

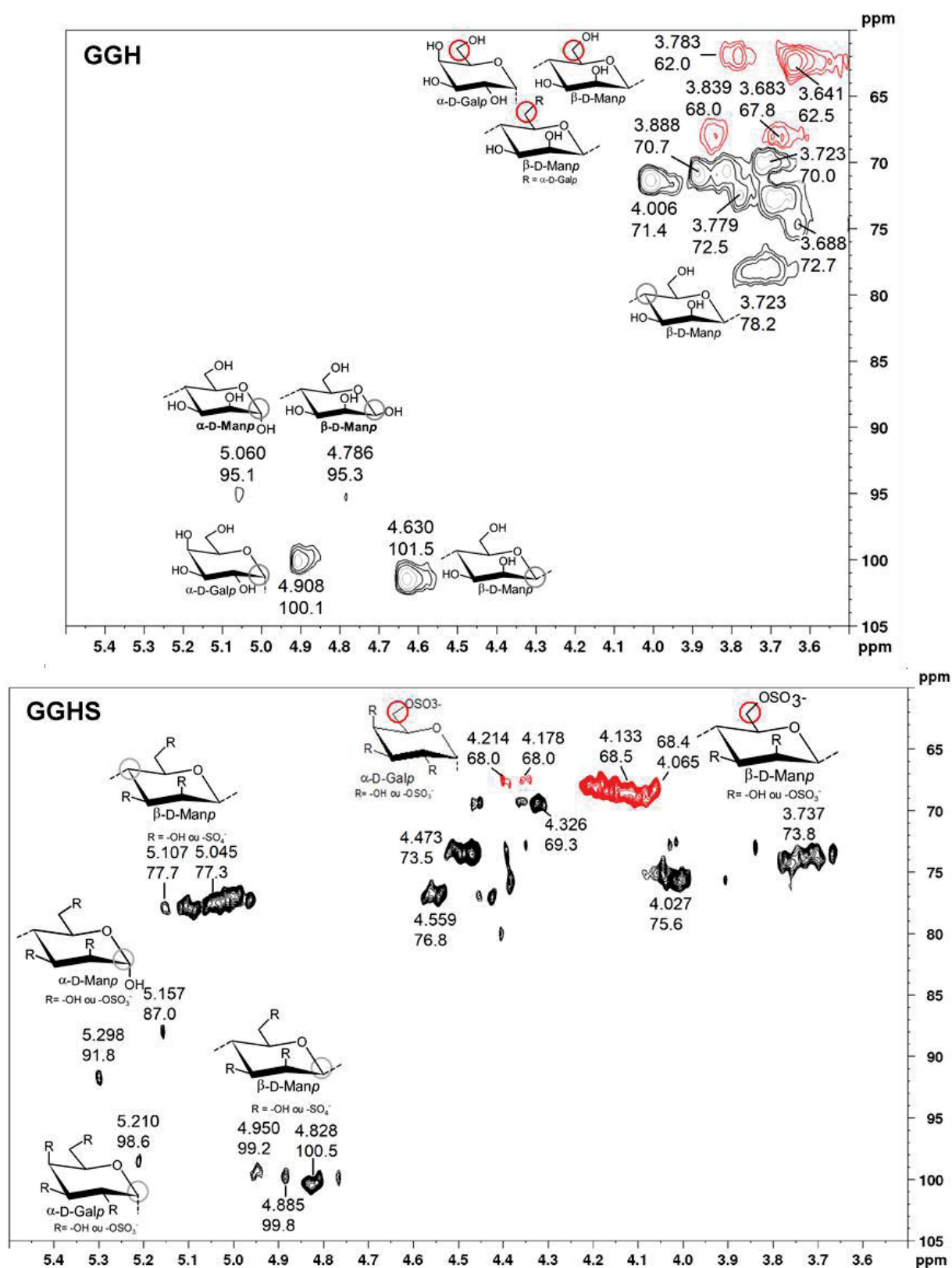


GGH E GGHS foram solubilizados em NaNO_2 0,1 M e filtrados em 0,22 μm previamente às análises em cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo WATERS 2410.

Observando os espectros de correlação HSQC mostrados na Figura S2 e comparando-os aos obtidos por Barddal e colaboradores (2020) observamos alta similaridade entre eles, sugerindo a reprodutibilidade do método químico de obtenção dos polímeros descrito pelos referidos autores. Vale destacar o significativo deslocamento de sinais observados no espectro de GGHS em relação ao espectro de GGH, o que sugere que o processo de sulfatação foi eficiente e que inseriu grupamentos sulfato em todas, ou praticamente todas, as unidades monossacarídicas. Esta observação está também de acordo com o grau de substituição (DS) calculado, que foi de 1.9. Os sinais anoméricos tanto das unidades de $\beta\text{-Manp}$ como de $\alpha\text{-Galp}$ sofreram deslocamento de aproximadamente 1 ppm para campo mais alto, referente ao efeito β devido à inserção de grupamentos sulfato na posição 2 de ambas as unidades. O mesmo foi observado para o sinal referente à ligação glicosídica das unidades de manose em O4. O deslocamento de sinal da ligação glicosídica de 3.72/78.2, observado no espectro de GGH, para 5.05/77.3, observado no espectro de GGHS, reflete a inserção de grupamentos sulfato na posição O3 destas unidades. Outra informação relevante do espectro do polissacarídeo sulfatado é a ausência de sinais referentes C6 livre (δ 3.78/62.0 e δ 3.64/62.5) com a presença apenas de sinais de C6-substituído, indicando que todas as unidades de manose que não estavam substituídas em O6 por galactose foram sulfatadas. Da mesma forma, os terminais não redutores de galactose presentes no

polímero também se apresentaram 6-O-sulfatados na estrutura de GGHS (H6/C6 assinalados em δ 4.21, 4.17/68.0).

FIGURA S2 – Espectros de correlação HSQC dos polissacarídeos GGH e GGHS



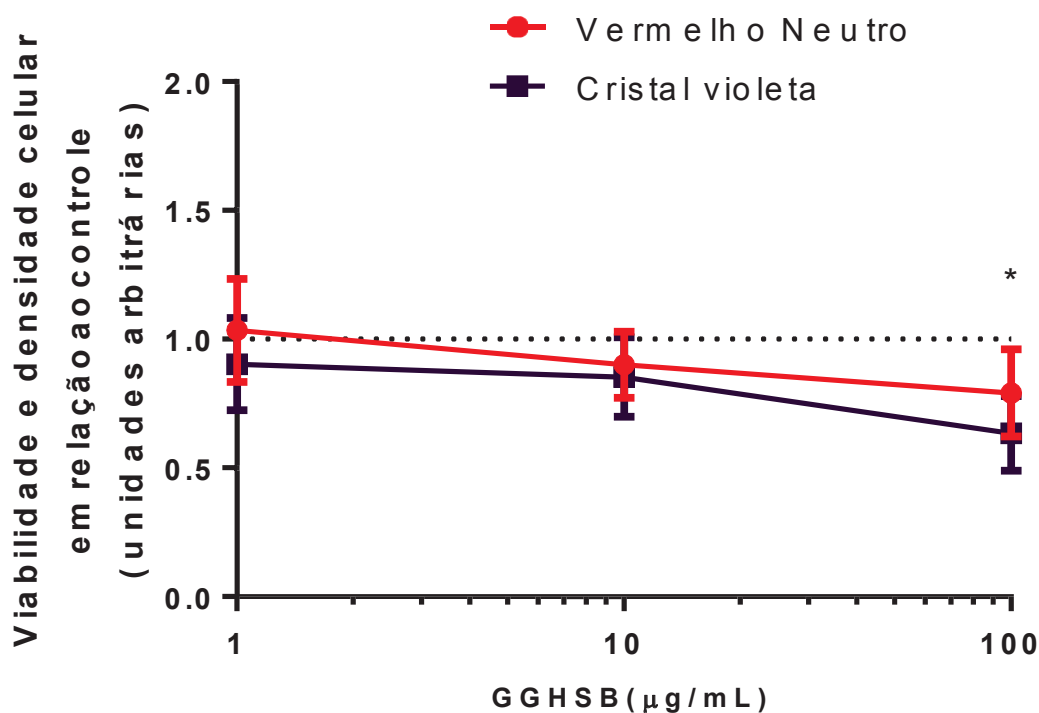
$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ referentes aos sinais observados nos espectros de HSQC-Ed dos polissacarídeos GGH e GGHS. Experimentos realizados a 50° em equipamento Bruker Avance 400MHz. Acima de alguns assinalamentos encontram-se estruturas esquemáticas e formas circulares indicando as correlações

ANEXO 2

TESTE DE REPRODUTIBILIDADE DE RESPOSTA BIOLÓGICA DE OUTRO LOTE DE GGHS – SINTETIZADO POR BARDDAL e colaboradores (2020). AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE MELANOMA

Para verificar se, além da reprodutibilidade química, o polissacarídeo sulfatado GGHS, obtido de diferentes lotes de síntese, teria uma reprodutibilidade de resposta biológica, foram realizados os ensaios de vermelho neutro e cristal violeta com o lote produzido por Barddal e colaboradores (2020), denominado GGHSB. Pode-se observar no gráfico a mesma resposta obtida para o GGHS, o qual foi sintetizado para este trabalho. Na concentração de 100 µg/mL, o GGHSB diminuiu a proliferação celular e, devido a isso, menos quantidade de vermelho neutro foi detectada no método de avaliação de viabilidade.

FIGURA S3 – Viabilidade e proliferação celular de células de melanoma quando expostas ao polissacarídeo GGHSB



Após 24 horas em cultura, células de melanoma B16-F10 foram expostas ou não (controle) a diferentes concentrações (1; 10 ou 100 µg/mL) GGHSB por 72 horas e, então, foram analisadas quanto a capacidade de retenção do corante vermelho neutro (VN) e a densidade celular pela coloração dos núcleos celulares pelo corante cristal violeta (CV). Foram realizados quatro

experimentos independentes em quadruplicata técnicas. Os dados estão apresentados como média \pm SD. A comparação entre os grupos foi realizada com os dados normalizados pelo controle (linha pontilhada) com o uso do teste T paramétrico não pareado com a correção de Welch's (* $p < 0,05$).